

明細書

有機酸存在下におけるプロモーター及びその利用

5 技術分野

本発明は、有機酸存在下におけるプロモーターDNA、DNA構築物、形質転換体、組換え遺伝子の発現方法、及びこれを利用した有機酸の生産方法に関する。

背景技術

- 10 組換えDNA技術の進歩により、微生物、カビ、動植物および昆虫などの宿主で外来遺伝子を発現させ、その形質転換体を増殖させることによって、目的遺伝子産物を取得する技術が発展してきた。例えば、遺伝子組換え酵母などの培養によれば、発酵生産により大量の目的遺伝子産物を生産させることも可能である。L-乳酸などの有用な有機酸の生産については、
- 15 L-乳酸脱水素酵素遺伝子を酵母サッカロマイセス・セレビシエ属に導入し、L-乳酸を生産させる試みが多数報告されている。

- 組換え体において目的産物の高生産性を確立するには、安定した遺伝子高発現系を構築することが必要である。本発明者らは、既に、染色体中のPDC1遺伝子プロモーターの下流に目的とする有用遺伝子(この場合
- 20 は、L-乳酸脱水素酵素遺伝子)を結合させると同時に、酵母染色体中のPDC1遺伝子を破壊することによって、本来のPDC1遺伝子プロモーター機能を利用してL-乳酸脱水素酵素遺伝子を発現させつつ、本来の当該プロモーターによって発現されるPDC1タンパク質の発現を排除するシステムを開発した。このシステムを用いることで、従来困難であった安定し
- 25 た遺伝子高発現系を確立できることを特開2003-164295号公報に開示している。

かかる安定した遺伝子高発現系が確立されたといえども、組換え産物の生産性をより一層高めるには、強力な発現能を備えるプロモーターが求められる。酵母で公表されているプロモーターとしては、アルコール脱水素酵素1遺伝子(ADH1)プロモーター(J Ferment Bioeng 1998, Vol. 8
5 6(3)p. 284-289)、及びトリオースリン酸イソメラーゼ遺伝子(TPI1)プロモーター(FEMS Microbial Lett 1999, Feb. Vol. 171(2)p. 13
3-140)等を挙げることができる。

発明の開示

10 しかしながら、ADH1プロモーターやTPI1プロモーター等は、乳酸のような有機酸を大量生産させることを目的に、有機酸生産に特異的でかつ強力な発現能を備えたプロモーターとしては必ずしも適していない。また、有機酸存在下で強力に発現するプロモーターとしても必ずしも適していない。そこで、本発明では、有機酸存在下において利用可能なプロモーター、該
15 プロモーターを含むDNA構築物、該DNA構築物を含む形質転換体、該形質転換体による組換え遺伝子の発現方法、該形質転換体を用いた有機酸の生産方法を提供することを、一つの目的とする。

本発明者らは、乳酸を生産している酵母又は乳酸を含む培地で生育する酵母より、mRNAを取得し、定量的PCR法によって詳細な遺伝子発現
20 解析を行ってきた。その結果、乳酸を生産している酵母において特異的に高発現している遺伝子を複数個見出し、そのプロモーターを単離した。そして、これらのプロモーター下流にL-乳酸脱水素酵素遺伝子を結合させた発現カセットを、既に確立した染色体上のPDC1遺伝子座に導入するとともに、酵母染色体上のPDC1遺伝子を破壊したところ、L-乳酸の大量
25 生産を確認した。すなわち、本発明者らは、有機酸生産下において目的遺伝子の転写を活性化するプロモーターを取得し、これらのプロモーター

が実際にL-乳酸の生産量を増大させることを確認し、本発明を完成した。

このように有機酸存在下において機能的に結合されたDNAの転写を活性化するプロモーターは、有機酸存在下において目的遺伝子の産物を増大させるのに有用であり、特に、有機酸生産下において目的遺伝子の産物の生産を増大させるのに有用である。したがって、本プロモーターは、有機酸生産に関連するタンパク質遺伝子を操作可能に結合し、有機酸の生産を増大させるのに使用できる。このプロモーターを利用すれば、遺伝子組換えにより、サッカロマイセス属などの酵母において乳酸などの有機酸を生産させるように形質転換した組換え体を得ることができ、このような組換え体は、有機酸の高生産性組換え体として有用である。

本発明は、有機酸存在下において利用可能なプロモーターに関し、具体的には以下の形態で提供される。

(1) 以下の(a)～(c)のいずれかに記載の塩基配列を有し、有機酸存在下での発現用プロモーターであるDNA。

(a) 配列番号: 1～6のいずれかに記載の塩基配列からなるDNA。

(b) 配列番号 1～6のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNA。

(c) 配列番号: 1～6のいずれかに記載の塩基配列において1あるいは2以上の塩基が置換、欠失、付加、及び／又は挿入された配列からなるDNA。

(2) (1)に記載のDNAの一部であって、有機酸存在下での発現用プロモーターであるDNA。

(3) サッカロマイセス属酵母の高浸透圧応答7遺伝子(HOR7遺伝子)、グリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素2遺伝子(TDH2遺伝子)、熱ショックタンパク質30遺伝子(HSP30遺伝子)、ヘキソース輸送タンパク質7遺

伝子 (HXT7 遺伝子)、チオレドキシンペルオキシダーゼ1 遺伝子 (AHP1 遺伝子)、及び膜タンパク質1 関連遺伝子 (MRH1 遺伝子) のいずれかの遺伝子のプロモーター活性を有し、有機酸存在下での発現用プロモーターであるDNA。

5 (4) 有機酸生産のためのDNAの発現用である(1)～(3)のいずれかに記載のDNA。

(5) 前記有機酸は乳酸である、(4)に記載のDNA。

(6) (1)～(3)のいずれかに記載のDNAを含む遺伝子組換え用DNA構築物。

10 (7) 前記DNAに機能的に結合された有機酸生産に関与するタンパク質をコードするDNAを備える、(6)に記載のDNA構築物。

(8) 前記有機酸生産に関与するタンパク質は乳酸脱水素酵素活性を有するタンパク質である、(7)に記載のDNA構築物。

(9) 前記タンパク質は、ウシ由来の乳酸脱水素酵素である、(8)に記載
15 のDNA構築物。

(10) さらに、オートレギュレーション機構を備える酵母遺伝子に対する相同組換え用のDNAを備える、(7)～(9)のいずれかに記載のDNA構築物。

(11) 前記酵母遺伝子は、ピルビン酸脱炭酸酵素1 (PDC1) 遺伝子で
20 ある、(10)に記載のDNA構築物。

(12) プラスミドベクター又はウイルスベクターである、(6)～(11)のいずれか記載のDNA構築物。

(13) (1)～(3)のいずれかに記載のDNAを保持する形質転換体。

(14) 前記DNAに機能的に結合された有機酸生産に関与するタンパク
25 質をコードするDNAを備える、(13)に記載の形質転換体。

(15) 前記有機酸生産に関与するタンパク質は、乳酸脱水素酵素活性

を有するタンパク質である、(14)に記載の形質転換体。

(16) (1)～(3)のいずれかに記載のDNAと前記乳酸脱水素酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAとは、宿主染色体上に組み込まれている、(14)又は(15)に記載の形質転換体。

5 (17) 酵母である、(13)～(16)のいずれかに記載の形質転換体。

(18) (1)～(3)のいずれかに記載のDNA及び該DNAに対して機能的に結合された乳酸脱水素酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAを酵母染色体上に保持し、これらのDNAの少なくとも一部によってオートレギュレーション機構を備える酵母遺伝子が破壊されている、形質転換酵

10 母。

(19) 前記オートレギュレーション機構を備える酵母遺伝子は、ピルビン酸脱炭酸酵素1遺伝子である、(18)に記載の形質転換酵母。

(20) 前記乳酸脱水素酵素活性を有するタンパク質は、ウシ由来の乳酸脱水素酵素である、(19)に記載の形質転換酵母。

15 (21) 前記酵母はサッカロマイセス属に属するものである、(18)～(20)のいずれかに記載の形質転換酵母。

(22) (1)～(3)のいずれかに記載のDNAと該DNAの下流に機能的に結合された所定のタンパク質をコードするDNAとを保持する宿主細胞を使用する、目的遺伝子の発現方法。

20

(23) 前記宿主細胞の培養系は有機酸を含有する、(22)に記載の方法。

(24) 前記宿主は酵母であり、(1)～(3)のいずれかに記載のDNAと前記タンパク質をコードするDNAとを酵母染色体上に保持し、これらのDNAの
25 少なくとも一部によってオートレギュレーション機構を備える酵母遺伝子が破壊されている、(22)又は(23)に記載の発現方法。

(25) 前記タンパク質は、有機酸生産に関与するタンパク質である、(24)に記載の発現方法。

(26) 前記タンパク質は、乳酸脱水素酵素活性を有するタンパク質である、(25)に記載の方法。

- 5 (27) (1)～(3)のいずれかに記載のDNAと該DNAの下流に機能的に結合された有機酸生産に関与するタンパク質をコードするDNAとを保持する形質転換酵母を使用する、有機酸の生産方法。

(28) 前記有機酸は乳酸であり、前記タンパク質は、乳酸脱水素酵素活性を有するタンパク質である、(27)に記載の方法。

- 10 (29) 前記DNAを酵母染色体上に保持し、これらのDNAの少なくとも一部によってピルビン酸脱炭酸酵素1遺伝子が破壊されている、(27)又は(28)に記載の生産方法。

(30) 以下の(a)～(c)のいずれかに記載のプロモーター活性を有するDNA。(a)配列番号:1～6のいずれかに記載の塩基配列からなるDNA。

- 15 (b)配列番号1～6のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNA。

(c)配列番号:1～6のいずれかに記載の塩基配列において1あるいは2以上の塩基が置換、欠失、付加、及び／又は挿入された配列からなるDNA。

- 20 (31) (30)に記載のDNAの少なくとも一部分を含み、プロモーター活性を有するDNA。

図面の簡単な説明

- 25 図1は、定量的PCRにより測定した乳酸発酵時におけるmRNA発現量を示すグラフ図である。

図2は、染色体導入型ベクター構築工程の一部を示す図である。

図3は、染色体導入型ベクター構築工程の一部を示す図である。

図4は、pBTRP-HOR7P-LDHベクターのマップを示す図である。

図5は、pBTRP-TDH2P-LDHベクターのマップを示す図である。

図6は、pBTRP-HSP30P-LDHベクターのマップを示す図である。

5 図7は、pBTRP-HXT7P-LDHベクターのマップを示す図である。

図8は、pBTRP-AHP1P-LDHベクターのマップを示す図である。

図9は、pBTRP-MRH1P-LDHベクターのマップを示す図である。

図10は、pBTRP-PDC1P-LDHベクターのマップを示す図である。

図11は、pBTRP-TDH3P-LDHベクターのマップを示す図である。

10 図12は、pBTRP-HOR7P-LDHベクターによる形質転換株における染色体構造を示す図である。

図13は、pBTRP-TDH2P-LDHベクターによる形質転換株における染色体構造を示す図である。

15 図14は、pBTRP-HXT7P-LDHベクターによる形質転換株における染色体構造を示す図である。

図15は、pBTRP-HSP30P-LDHベクターによる形質転換株における染色体構造を示す図である。

図16は、pBTRP-AHP1P-LDHベクターによる形質転換株における染色体構造を示す図である。

20 図17は、pBTRP-MRH1P-LDHベクターによる形質転換株における染色体構造を示す図である。

図18は、pBTRP-PDC1P-LDHベクターによる形質転換株における染色体構造を示す図である。

25 図19は、pBTRP-TDH3P-LDHベクターのマップによる形質転換株における染色体構造を示す図である。

図20は、各種形質転換酵母株における乳酸発酵試験の結果(YPD培

養液)を示すグラフ図である。

図21は、各種形質転換酵母株における乳酸発酵試験の結果(ケーンジューズ培養液)を示すグラフ図である。

5 発明を実施するための最良の形態

- 本発明のプロモーターは、有機酸存在下において発現を活性化あるいは促進する。すなわち、本発明のプロモーターは、本プロモーターに対して機能的に結合されたタンパク質をコードするDNAの発現を、有機酸の存在下においてはじめて活性化するか、有機酸の存在しないときよりも促進するか、あるいは有機酸の濃度が高まると促進するプロモーター活性を有する(以下、当該活性を本プロモーター活性という。)。ここで、「機能的な結合」とは、結合されたタンパク質をコードするDNAの発現を本プロモーターの影響下あるいは支配下におくような結合をいう。なお、「有機酸」とは、酸性を示す有機化合物であるが、有機酸が備える酸性基としては好ましくはカルボン酸基である。また、有機酸は、遊離の酸の他、有機酸塩を含む。
- このような有機酸として、具体的には、乳酸、酪酸、酢酸、ピルビン酸、コハク酸、ギ酸、リンゴ酸、クエン酸、マロン酸、プロピオン酸、アスコルビン酸、アジピン酸などを挙げることができ、好ましくは、乳酸である。乳酸には、L-乳酸、D-乳酸、及びDL-乳酸があるが、これらのいずれをも含む。「有機酸の存在下」とは、有機酸が本発明のプロモーターDNAを保持する宿主の成育環境において存在することを意味し、該有機酸は本発明のプロモーターを保持する宿主が生産するものであってもよいし、培地など宿主以外から供給されるものであってもよいし、これらの双方であってもよい。有機酸の培養系における濃度は特に限定されず、本発明のプロモーターに機能的に結合されたコードDNAが発現されあるいは促進される範囲であればよい。

本発明の有機酸存在下において転写を活性化するプロモーターDNAは、配列番号：1～6のいずれかに記載される配列からなるプロモーター活性を有するDNAを挙げることができる。本発明のプロモーターDNAは、これらの配列からなるDNAの他、これらの配列のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズし、かつ上記プロモーター活性を備えるDNAも含まれる。このようなDNAは、配列番号：1～6のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAあるいはその一部をプローブとして、一般的なハイブリダイゼーション技術 (Southern, EM., J Mol Biol, 1975, 98, 503.) により得ることができる。また、かかるDNAは、配列番号：1～6のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAに特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPCR技術 (Saiki, RK. Science, 1985, 230, 1350., et al., Saiki, RK. et al., Science, 1988, 239, 487) により合成することもできる。かかるハイブリダイゼーションあるいはPCRによって配列番号：1～6のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAと相同性の高いDNAを単離することができる。単離には、好ましくは、ストリンジェントな条件でハイブリダイゼーションを行う。ストリンジェントな条件としては、50%ホルムアミド存在下でハイブリダイゼーション温度が37℃であるハイブリダイゼーション条件あるいはこれと同様のストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件を意味している。よりストリンジェンシーの高い条件によれば、より相同性の高いDNAを単離できる。かかるハイブリダイゼーション条件としては、例えば、50%ホルムアミド存在下でハイブリダイゼーション温度が約42℃、さらにストリンジェンシーの高い条件としては、50%ホルムアミド存在下で約65℃のハイブリダイゼーション条件を挙げることができる。

さらに、本発明のプロモーターDNAとしては、配列番号：1～6のいずれかに記載される塩基配列において、1あるいは2以上の塩基が置換、欠失、付加、及び／又は挿入された塩基配列からなり、本プロモーター活性を有

するDNAであってもよい。このようなDNAは、既に述べたハイブリダイゼーション技術やPCR技術等によって得ることもできるし、また、Site-directed mutagenesis法(Kramer, W. & Fritz, HJ., Method Enzymol., 1987, 154, 350)によって、配列番号:1~6のいずれかに記載の塩基配列に人工的に変異を導入することによっても得ることができる。

なお、配列番号:1~6のいずれかに記載の塩基配列との相同性は、単離されたDNAにおいて70%以上であることが好ましく、より好ましくは80%以上であり、さらに好ましくは90%以上である。なお、DNAの塩基配列のホモロジーは、遺伝子解析プログラムBLASTなどによって決定することができる。なお、DNAの塩基配列のホモロジーは、遺伝子解析プログラムBLAST(<http://blast.genome.ad.jp>), FASTA(<http://fasta.genome.ad.jp/SIT/FASTA.html>)などによって決定することができる。

配列番号:1~6に記載の塩基配列からなる各DNAは、それぞれ、酵母
15 サッカロマイセス セレビシエの高浸透圧応答7遺伝子(HOR7遺伝子)、
グリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素2遺伝子(TDH2遺伝子)、ヘキソ
ース輸送タンパク質7遺伝子(HXT7遺伝子)、熱ショックタンパク質30遺
伝子(HSP30遺伝子)、チオレドキシンペルオキシダーゼ1遺伝子(AHP1
遺伝子)、及び膜タンパク質1関連遺伝子(MRH1遺伝子)の遺伝子のプ
20 ロモーター活性を有するDNA断片として取得されたものである。したがって、
本発明のプロモーターDNAは、酵母、あるいはサッカロマイセス属酵母の
これらの遺伝子のプロモーター活性を有するDNAあるいはかかるプロモ
ーター領域に相同性を有し、本プロモーター活性を有するDNAであってもよ
い。このようなDNAは、配列番号:1~6のいずれかに記載の塩基配列の
25 少なくとも一部からなるプローブを用いたハイブリダイゼーション技術や、該
塩基配列にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプローブを用いたPCR技

術を利用して、酵母から取得することができる。さらに、上述したストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNAを選択することができる。

なお、本発明のプロモーターDNAは、本プロモーター活性を有する限りこのような各種形態のDNAの一部であってもよく、または少なくとも一部分を含むものであってもよい。

配列番号：1～6に記載の塩基配列からなる各DNAは、乳酸生産酵母において中和条件下（pH4.0～pH8.0）において乳酸発酵下におけるスクリーニングを経て選択されたものである。スクリーニングは、乳酸生産酵母を用いて前記中和条件下において乳酸発酵を行い、発酵開始後一定期間後において採取されたmRNAから得られるcDNAを、定量的PCR技術等により定量することにより高い発現量を示した遺伝子を選抜するものである。このようなスクリーニングにより、乳酸生産酵母において乳酸生産時（乳酸存在時）において、高発現する遺伝子を抽出することができ、かかる遺伝子のプロモーターを単離することで、乳酸生産時（乳酸存在時）において高い遺伝子発現を示すプロモーターを得ることができる。

かかるスクリーニングによって得られるプロモーターは、同時に乳酸によって遺伝子の発現を誘導する乳酸誘導的プロモーターであるということもできる。したがって、かかるプロモーターに乳酸脱水素酵素などの乳酸生産に関与する酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAを機能的に結合することで、乳酸の生産量の増大によって乳酸の生産が抑制されない、あるいは乳酸の生産量の増大によってさらに乳酸の生産が促進される実用的な乳酸生産酵母などの形質転換体を得ることが大いに期待される。

なお、取得したDNAが本プロモーター活性を有するか否かは、当業者において公知のレポーター遺伝子を用いたレポーターアッセイにより確認することができる。レポーター遺伝子としては、特に制限することなく公知の遺伝子を用いることができ、例えば、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラ

ーゼ遺伝子 (CAT)、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子 (LacZ)、ルシフェラーゼ
遺伝子 (LUC)、 β -グルクロニダーゼ及びグリーンフロッセントプロテイン
遺伝子 (GFP) 等を挙げることができる。この他、遺伝子の発現の確認を該
5 遺伝子によってコードされるタンパク質量や該タンパク質 (酵素) の活性 (例
えば、代謝産物の量) を測定可能な遺伝子を用いて、本プロモーター活
性の存否を確認することも可能である。さらに他には、遺伝子が発現される
ことにより得られる mRNA を利用したノーザンハイブリダイゼーション法や定
量的 PCR 法等を用いて遺伝子の転写レベルを測定することによっても本
10 プロモーター活性を確認することができる。なお、本プロモーター活性は、
有機酸の存在下において発現を活性化あるいは促進するものであるため、
本プロモーター活性の確認にあたっては、有機酸が存在する培養系ある
いは有機酸を生産する宿主を用いることが好ましい。

本発明のプロモーター DNA は、ゲノム DNA であってもよく、また、化学的
に合成された DNA であってもよい。

15 本発明は、本プロモーター DNA を含む組換え用 DNA 構築物も提供す
る。組換え用 DNA 構築物は、特に限定しないでプラスミド (DNA)、ウイル
ス (DNA) バクテリオファージ (DNA)、レトロトランスポゾン (DNA)、人工染
色体 (YAC、PAC、BAC、MAC 等) を、外来遺伝子の導入形態 (染色
体外あるいは染色体内) や宿主細胞の種類に応じて選択してベクターとし
20 ての形態をとることができる。したがって、本 DNA 構築物は、本プロモータ
ー DNA の他、これらのいずれかの態様のベクターとしての DNA 等を備える
ことができる。本 DNA 構築物は、好ましくは、プラスミドベクター又ウイルス
ベクターの形態を採る。また、好ましい原核細胞性ベクター、真核細胞性
ベクター、動物細胞性ベクター、植物細胞性ベクターは当該分野において
25 周知である。本 DNA 構築物は、細胞質あるいは宿主細胞において宿主
染色体外において保持されていてもよいし、また、宿主染色体に組み込ま

れて保持されていてもよい。

- 本DNA構築物は、本プロモーターDNAに対して機能的に結合された所望のタンパク質をコードするDNA(以下、コードDNAともいう。)を備えている。コードDNAは、cDNAのみならず、転写されても翻訳されないDNA
- 5 配列を含むものであってもよい。タンパク質は特に限定しないが、コードDNAは乳酸等の有機酸生産のためのDNA、すなわち、有機酸生産に関連する酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAとすることができる。かかるタンパク質をコードするDNAを本プロモーターDNAに対して機能的に結合させることで、相乗的に有機酸生産が促進されることが期待される。こ
- 10 のような酵素としては、乳酸生産の場合には、L-乳酸脱水素酵素、D-乳酸脱水素酵素等の酵素、ピルビン酸生産の場合にはピルビン酸キナーゼ等、酢酸生産の場合にはピルビン酸オキシダーゼ等、コハク酸生産の場合にはスクシニルCoAシンテターゼ等、リンゴ酸の場合にはフマル酸ヒドラターゼ等、クエン酸生産の場合にはクエン酸シンテターゼ等を例示できる。
- 15 乳酸脱水素酵素(LDH)としては、生物の種類に応じてあるいは生体内においても各種同族体が存在する。本発明において使用する乳酸脱水素酵素としては、天然由来のLDHの他、化学合成的あるいは遺伝子工学的に人工的に合成されたLDHも包含している。LDHとしては、好ましくは、乳酸菌などの原核生物もしくはカビなどの真核微生物由来であり、より
- 20 好ましくは、植物、動物、昆虫などの高等真核生物由来であり、さらに好ましくは、ウシを始めとする哺乳類を含む高等真核生物由来である。最も好ましくは、ウシ由来のLDH(L-LDH)である。例えば、ウシ由来のLDHとして配列番号:8に示すアミノ酸配列からなるタンパク質を挙げることができる。また、かかるLDHをコードするDNAとしては、配列番号:7に記載される
- 25 塩基配列からなるDNAを挙げることができる。さらに、本発明におけるLDHは、これらのLDHのホモログも包含している。LDHホモログは、天然由来

のLDHのアミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入および／または付加されたアミノ酸でありかつLDH活性を有しているタンパク質、および、天然由来のLDHとアミノ配列の相同性が少なくとも70%、好ましくは80%以上を有しかつLDH活性を有しているタンパク質を含んでいる。

本DNA構築物においては、相同組換えにより本プロモーターDNA及びコードDNAを宿主染色体に組み込むための相同組換え用のDNA配列を備えることができる。このようなDNAを備えることにより、宿主染色体の所望の部位にこれらのDNAの組み込みを達成する他、所望の遺伝子の破壊を同時に達成することができる。相同組換え用DNA配列は、宿主染色体において本DNAを導入しようとするターゲット部位あるいはその近傍のDNA配列と相同なDNA配列である。相同組換え用DNA配列は、一つのターゲット遺伝子あるいはその近傍の少なくとも1箇所に相同である1の配列を有しており、好ましくは、ターゲット遺伝子あるいはその近傍の少なくとも2箇所にそれぞれ相同な配列を備えている。例えば、2個の相同組換え用DNA配列を、染色体上のターゲット部位の上流側と下流側のDNAとのそれぞれに相同なDNA配列とし、これらの相同組換え用DNA配列の間に本プロモーターDNAやコードDNAを連結することが好ましい。

本DNA構築物は、宿主染色体上に相同組換えにより宿主染色体に本DNAを導入する場合であって、適切な相同組換え用DNAを選択することで、宿主染色体上の所望の部位において、本プロモーターDNA及びコードDNAを組み込んで、本プロモーターDNAによりコードDNAの発現を制御することができるようになる。このような染色体上への組み込みを実現するための相同組換え用DNAの選択は、当業者において周知であり、当業者であれば必要に応じて適切な相同組換え用DNAを選択して相同組換え用DNA構築物を構成することができる。

本プロモーターDNAを宿主染色体が本来的に備えている場合には、適切な相同組換え用DNAを選択することで、宿主染色体上において本プロモーターDNAが本来的に存在する部位において、本プロモーターDNA及びコードDNAを組み込むこともできる。こうすることで、染色体上の本プロモーターDNAが本来制御すべき内在性コードDNAに替えて、本プロモーターDNAによって外来性コードDNAを制御させることができる。この結果、本来発現が活性化されるべき内在性コードDNAの発現を抑止する一方、本プロモーターDNAが本来的に存在する染色体上の部位において、本プロモーターDNAによって外来性のコードDNAの発現を活性化させることができる。このようなDNA構築物は、本プロモーターDNAと、本プロモーターによって制御される内在する構造遺伝子の少なくとも一部を相同組換え用DNAとして備えることでこのような宿主染色体上への組み込みが可能となる。

なお、相同組換え用DNAの選択により、本プロモーターDNAの染色体組み込みと同時に宿主染色体上の所望の遺伝子を破壊することができる。破壊する遺伝子は、オートレギュレーション機構が存在する遺伝子であることが好ましいが、これについては後述する。例えば、サッカロマイセス属酵母などの酵母において、有機酸生産に関与するタンパク質をコードするDNAを用いて有機酸を生産する場合、ピルビン酸脱炭酸酵素遺伝子（特に、ピルビン酸脱炭酸酵素1遺伝子）を破壊することが好ましい。ピルビン酸脱炭酸酵素1遺伝子のプロモーターは強力であるからであり、後述するようにオートレギュレーション機構を備えているからである。該遺伝子を破壊する組み込みにより、ピルビン酸脱炭酸酵素の発現を抑制し外来DNAによってコードされたタンパク質を発現させることができる。さらに、本プロモーターによって、外来コードDNAの発現は有機酸存在下において発現が活性化されるため、発現されたタンパク質により有機酸生産が促進されることで

一層外来コードDNAの発現が促進される。

特に、乳酸脱水素酵素をコードするDNAを用いて乳酸を生産する場合
には、当該破壊形態が一層有効である。ピルビン酸脱炭酸酵素1遺伝子
は、乳酸脱水素酵素の基質であるピルビン酸を基質とし乳酸脱水素酵素
5 に対して競合的に作用するからである。該遺伝子を破壊することで、ピルビ
ン酸脱炭酸酵素の発現を抑制し乳酸脱水素酵素を発現させることができ、
同時に乳酸脱水素酵素は本プロモーターDNAにより有機酸(乳酸)存在
下において発現が活性化されるため、乳酸生産がより一層促進されるもの
と期待される。このような染色体上への組み込みを達成するにあたっては、
10 本DNA構築物は、例えば、ピルビン酸脱炭酸酵素の構造遺伝子の一部
あるいはその近傍の配列(開始コドンの近傍の配列、開始コドンの上流域
の配列(この構造遺伝子のプロモーターを含む)、構造遺伝子内の配列
等)、あるいはさらに染色体上の該遺伝子の上流域及び／又は下流側と
相同なDNA配列を含むことができる。好ましくは、サッカロマイセス属(特に
15 セレビシエ)を宿主として、この宿主のピルビン酸脱炭酸酵素1遺伝子をタ
ーゲットとするDNA構築物とする。

ピルビン酸脱炭酸酵素遺伝子のプロモーターは強力なプロモーターであ
ることから、本プロモーターDNAと組み合わせて使用することができる。す
なわち、酵母染色体上のピルビン酸脱炭酸酵素遺伝子(好ましくはピルビ
20 ン酸脱炭酸酵素1遺伝子)の内在部位において、当該遺伝子プロモータ
ーによって本来制御されるべき構造遺伝子に替えて乳酸脱水素酵素活
性を有するタンパク質をコードするDNAを導入する相同組換え用DNA構
築物と、酵母染色体上の本DNAプロモーターに内在部位において本DN
Aプロモーターによって本来制御されるべき構造遺伝子に替えて乳酸脱
25 水素酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAを導入する相同組換
え用DNA構築物とを用いることができる。PDC(好ましくはPDC1)遺伝子

プロモーターと本プロモーターDNAとの双方による発現促進効果と、PDC
(好ましくはPDC1)構造遺伝子の破壊によるピルビン脱炭酸酵素遺伝子
の発現抑制とによって、一層効果的な乳酸製造が期待される。また、PDC
1遺伝子が破壊されていても、代替的に他のPDC5遺伝子等によりピルビ
ン酸脱炭酸酵素は生合成されるため、酵母の増殖性能は確保されている。
5 なお、このようなDNA構築物には、PDC1プロモーター活性を有するDNA
を、プロモーターDNA及び相同組換え用DNAの双方の機能を発揮する
ものとして保持することができる。PDC1プロモーターDNAとしては、配列
番号:9に記載の塩基配列からなるDNAの他、該DNAとストリンジェントな
10 条件でハイブリダイズするDNA、該塩基配列において1あるいは2以上の
塩基が置換、欠失、付加、及び／又は挿入された配列からなるDNAを用
いることができる。このようなDNAは、本プロモーターDNAと同様にして単
離することができる。

なお、PDC1遺伝子は、本発明者らが既に関示しているように、オートレ
15 ギュレーション機構が存在する遺伝子である(特開2003-164295号)。
オートレギュレーション機構とは、同じ機能を有する遺伝子が同一生物に
おいて複数存在し、通常、そのうちの少なくとも一つは発現しているが、残
りは抑制されており、通常発現している遺伝子が破壊などにより機能しな
くなった場合にのみ、残りの遺伝子が発現されてその機能を継続する機構
20 を意味している。かかる機構が存在するため、例えば、酵母のPDC1遺伝
子が破壊されたとしても、PDC5遺伝子が活性化され、酵母のエタノール
生産機能は維持され、生理的機能が維持されることになる。このようなオー
トレギュレーション機構が存在する遺伝子を破壊することで、生物自体の
生存、増殖機能を維持することができて、結果として、外来DNAを保持す
25 る形質転換体の増殖を維持しながら目的産物を効果的に生産させること
ができる。

なお、DNA構築物には、ターミネーター他、必要に応じてエンハンサーなどのシスエレメント、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、リボソーム結合配列(SD配列)を連結することができる。選択マーカーとしては、特に限定しないで、薬剤抵抗性遺伝子、栄養要求性遺伝子

5 などを始めとする公知の各種選択マーカー遺伝子を利用できる。例えば、アンピシリン耐性遺伝子、カナマイシン耐性G418遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、ブレオマイシン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子、シクロヘキシミド耐性遺伝子等を使用することができる。

- 10 本DNA構築物は、適当な宿主細胞に、トランスフォーメーション法や、トランスフェクション法、接合法、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション法、リポフェクション法、酢酸リチウム法、パーティクルガン法、リン酸カルシウム沈殿法、アグロバクテリウム法、PEG法、直接マイクロインジェクション法等の各種の適切な手段のいずれかにより、これを導入することができる。本D
- 15 NA構築物の導入後、その受容細胞は、選択培地で培養される。

宿主細胞は、*Eshrichia coli*、*Bacillus subtilis* などの細菌、サッカロマイセス・セレビシエ、シゾサッカロマイセス・ポンベ(*Saccharomyces pombe*)などのサッカロマイセス属酵母、ピキア・パストリス(*Pichia pastoris*)などの酵母、sf9、sf21等の昆虫細胞、COS細胞、チャイニーズハムスター卵巣

20 細胞(CHO細胞)などの動物細胞、サツマイモ、タバコなどの植物細胞などとすることができる。好ましくは、酵母などのアルコール発酵を行う微生物あるいは耐酸性微生物であり、例えば、サッカロマイセス・セレビシエなどのサッカロマイセス属を始めとする酵母である。より具体的には、サッカロマイセス・セレビシエIFO2260株や同YPH株を例示できる。

- 25 なお、本DNA構築物が宿主に導入されたか否か、あるいは染色体上の所望の部位に本DNA構築物が導入されたか否かの確認は、PCR法やサ

ザンハイブリダイゼーション法により行うことができる。例えば、形質転換体からDNAを調製し、導入部位特異的プライマーによりPCRを行い、PCR産物について、電気泳動において予期されるバンドを検出することによって確認できる。あるいは蛍光色素などで標識したプライマーでPCRを行うことも確認できる。これらの方法は、当業者において周知である。

本DNA構築物によって形質転換された形質転換体においては、DNA構築物の構成成分である本プロモーターDNAやコードDNA等が染色体上あるいは染色体外因子（人工染色体を含む）上に存在することになる。上述のDNA構築物であって、相同組換えを達成できる相同組換え用DNA構築物が導入されると、宿主染色体上の所望の位置に本プロモーターDNAと該DNAに対して機能的に結合されたコードDNAを保持する形質転換体を得られる。

宿主染色体に対する相同組換えにより得られる形質転換体の好ましい一形態は、本プロモーターDNAが本来内在する染色体上の部位において、本プロモーターDNAに対して機能的に結合されたコードDNAを備える形態である。かかる形質転換体によれば、有機酸存在下において本プロモーターDNAによりコードDNAの発現が活性化されるため、有機酸存在下にて目的産物を効果的に得ることができる。この形態においては、好ましくは、コードDNAは、乳酸脱水素酵素活性を有するタンパク質をコードしている。かかる形質転換体は、当該乳酸脱水素酵素活性により乳酸を製造し、さらに該乳酸製造によりさらなる該酵素活性の発現が促進され、乳酸製造が促進される。

また、本発明の形質転換体の好ましい他の一形態は、宿主（酵母等）染色体上のオートレギュレーション機構を備える遺伝子が破壊されているとともに、該遺伝子のプロモーターに替えて本プロモーターDNAと該DNAに機能的に結合されたコードDNAを備える形態である。かかる形質転換体

によれば、特に、これらのDNAによって、宿主に致命的な機能障害を与えることなく、コードDNAを発現させることができる。コードDNAとして乳酸脱水素酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAを用いる場合、宿主の増殖性等に障害を及ぼすことを抑制して乳酸を製造することができる。

- 5 さらに、本発明の形質転換体の好ましい他の一形態は、宿主（酵母等）染色体上のPDC1遺伝子が破壊されているとともに、該遺伝子のプロモーターに替えて本プロモーターDNAと該DNAに機能的に結合されたコードDNAを備える形態である。かかる形質転換体によれば、特に、コードDNAとして乳酸脱水素酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAを用いる
- 10 場合、競合するピルビン酸脱炭酸酵素の発現を抑制して、本プロモーターDNAにより乳酸脱水素酵素を発現させることができ、乳酸製造に適した形質転換体を得ることができる。既に述べたようにPDC1遺伝子を破壊しても、該遺伝子には、オートレギュレーション機構が存在するため、宿主の増殖性等が保持されている。
- 15 さらにまた、他の好ましい形質転換体の一形態としては、宿主染色体上に本プロモーターDNAと該DNAに機能的に結合したコードDNAを備えるとともに（例えば、上記した好ましい三形態のいずれかあるいはこれらの組み合わせで）、宿主染色体上あるいは宿主染色体外において、PDC1プロモーターDNAと該DNAに機能的に結合したコードDNAを備える形態で
- 20 ある。かかる形態によれば、コードDNAをいずれも乳酸等の有機酸の生合成に関連する酵素活性を有するタンパク質をコードするものとしたとき、PDC1プロモーターにより構成的に有機酸の生合成酵素の発現が活性化される一方、本プロモーターDNAにより有機酸誘導的に有機酸生合成酵素の発現が活性化されるため、高効率な有機酸生産が期待される。特に、
- 25 PDC1プロモーターとして宿主染色体上に内在するものを利用する形態であることが好ましい。この場合、PDC1プロモーターによる安定的な発現が

可能となる。

なお、これらの形質転換体においては、宿主は酵母であることが好ましく、なかでも、サッカロマイセス属酵母であることが好ましく、さらに、サッカロマイセス セレビシエであることが好ましい。さらに、コードDNAは、乳酸脱水素酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAであることが好ましく、より好ましくは、ウシ由来の乳酸脱水素酵素をコードするDNAである。

本発明においては、宿主染色体において本プロモーターDNAによりコードDNAを発現させることが重要である。特に、本来有機酸を生産しないあるいは本来の有機酸生産量より当該生産量を増大させるような形質転換体として取得しようとするとき、2 μ mDNAを利用したYEPタイプのプラスミドベクターによる方法がよく用いられているが、この場合、かかるコードDNAは保持されにくいことが報告されている。しかしながら、本発明においては、このようなDNA保持率が単に高いことのみによるとは思えない高い発現活性が見出されている。したがって、本発明によれば、有機酸存在下で本プロモーターDNAを染色体上において利用し、該DNAに機能的に結合したコードDNAの発現を活性化することでコードDNAの安定かつ予想を超える高発現性を備える遺伝子発現系を構築することができる。さらに、コードDNAが乳酸脱水素酵素のように有機酸の生合成に関連する酵素活性を有するタンパク質をコードするものとした場合には、本プロモーターDNAによって発現が活性化されたコードDNAの最終産物たる有機酸によってさらに本プロモーターDNAによるコードDNAの発現の活性化が期待できる。すなわち、相乗的かつ連続的なタンパク質の生合成及び最終産物の生合成の促進が期待できる。

また、コードDNAとして乳酸脱水素酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAを用いた場合において、本プロモーターDNAとコードDNAを宿主染色体のPDC1遺伝子に導入し破壊することにより、上記した効果に

加えて、PDC1遺伝子の破壊によるピルビン酸脱炭酸酵素発現の抑制効果によって、効果的に乳酸製造を促進することができる。

本発明のプロモーターDNAの下流に乳酸脱水素酵素をコードするDNAを結合させて染色体中に導入するのにあたり、乳酸生産量の増大を目的として、この遺伝子導入断片を染色体中に複数個導入した形質転換体を作ることができる。この場合、本プロモーターDNAは単一の種類を使用することができる他、本プロモーターを2種類以上組み合わせて使用することもできる。ここで、本プロモーターを2種類以上組み合わせて使用する形態とは、それぞれのプロモーターにコードDNAを結合させてそれぞれのプロモーターにより乳酸脱水素酵素を発現させる形態をいう。例えば、本プロモーターDNAのうち2種類以上のプロモーターDNAのそれぞれに乳酸脱水素酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAを結合させて作製した1種あるいは2種類以上の遺伝子導入断片を導入した形質転換体を作ることができる。より具体的に例示すると、HOR7プロモーターの下流にコードDNAを結合させた遺伝子導入断片と、TDH2プロモーターの下流にコードDNAを結合させた遺伝子導入断片とを宿主に導入することで、HOR7プロモーターによる乳酸脱水素酵素活性を有するタンパク質の発現と、TDH2プロモーターによる乳酸脱水素酵素活性を有するタンパク質の発現とが同一形質転換体内で組み合わされて発現される形質転換体を得ることができる。なお、上記プロモーターに限定されず、例えばPDC1プロモーターなどの他のプロモーターと組み合わせることもできる。

本発明を拘束するものではないが、このように宿主染色体上で該染色体上に本来的に内在するプロモーター(本プロモーターDNAやPDC1プロモーター)を用いて乳酸脱水素酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAの発現を活性化することにより、予測を超えた乳酸生産量の増大が得られたことは、染色体上のこれらのプロモーターの本来内在される部位にお

いて、これらのプロモーターにより本来制御されるべき構造遺伝子に替えて
乳酸脱水素酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAを発現させた
ことに主たる起因があると考えられる。すなわち、染色体上のこれらのプロモ
ーター部位において該プロモーターを利用して他の乳酸脱水素酵素を代
5 替的に発現させるか、あるいは該プロモーター及び構造遺伝子に替えて
他のプロモーターにより乳酸脱水素酵素を代替的に発現させることが重要
であると考えられる。さらに、これらの起因事項に加え、PDC1プロモーター
については、PDC1プロモーターが強力な構成的プロモーターであり、かつ
オートレギュレーション機構を備える遺伝子のプロモーターであることも乳酸
10 生産量の増大に寄与していると考えられ、また、本プロモーターDNAにつ
いては、有機酸（乳酸）の存在下において発現を活性化する誘導的プロモ
ーターであることが寄与していると考えられる。

本DNA構築物が導入されて得られる形質転換体を培養することにより、
培養物中に外来遺伝子の発現産物であるタンパク質を生成させることが
15 できる。このような発現方法によれば、有機酸存在下においてコードDNA
の発現が促進されるため、培養系に有機酸を添加するなどにより有機酸を
培養系に存在させることで、有用タンパク質の生産を促進することができる。
また、コードDNAが有機酸生産に関与するタンパク質をコードするものであ
る場合、該コードDNAの発現が促進されて有機酸が生産されれば、それ
20 によって、さらにコードDNAの発現が促進される。なお、コードDNAが有機
酸生産に関与するタンパク質をコードするものであっても、培養系に外部か
ら有機酸を添加することができる。該タンパク質が、乳酸脱水素酵素等の
有機酸の生合成に関連する酵素である場合、培養系においては乳酸等
の有機酸が生産される。培養系から有機酸を分離する工程を実施するこ
25 とにより、有機酸を得ることができる。なお、本発明において培養物とは、培
養上清の他、培養細胞あるいは菌体、細胞若しくは菌体の破砕物を包含

している。

本発明の形質転換体の培養にあたっては、形質転換体の種類に応じて培養条件を選択することができる。このような培養条件は、当業者においては周知である。乳酸などの有機酸の生産にあたっては、必要に応じて産物
5 である乳酸等の中和を行うかあるいは、連続的に乳酸を除去する等の処理を行うこともできる。大腸菌や酵母等の微生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、微生物が資化可能な炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行うことができる培地であれば、天然培地、合成培地のいずれも使用することができる。炭
10 素源としては、グルコース、フルクトース、スクロース、デンプン、セルロース等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコールを用いることができる。窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩またはその他の含窒素化合物の
15 他、ペプトン、肉エキス、コーンステープリカー等を用いることができる。無機物としては、リン酸第一カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウムなどを用いることができる。

培養は、通常、振とう培養または通気攪拌培養等の好気条件下、30℃
20 で6～24時間行う。培養期間中、pHは2.0～6.0に保持することが好ましい。また、pHの調整は、無機あるいは有機酸、アルカリ溶液等を用いて行うことができる。培養中は、必要に応じてアンピシリン、テトラサイクリンなどの抗生物質を培地に添加することができる。

培養終了後、培養物から遺伝子産物を分離するには、通常の乳酸精
25 製手段を使用することができる。例えば、形質転換細胞内に生産された場合は、常法により菌体を超音波破壊処理、摩砕処理、加圧破碎などに細

胞を破壊して、遺伝子産物を細胞と分離することができる。この場合、必要に応じてプロテアーゼを添加する。また、培養上清に遺伝子産物が生産された場合には、この溶液を、ろ過、遠心分離などにより固形分を除去する。

- これらの粗抽出画分に対しては、従来公知の各種精製分離法等を利用して、乳酸を精製することができる。また、必要に応じて、当該粗抽出画分及びその精製物に対してエステル化等を行うことにより、各種の乳酸誘導体を得ることができる。

実施例1

- 以下に、本発明の具体例を記載するが、本発明を以下の具体例に限定する趣旨ではなく、本発明の要旨を逸脱しない範囲で種々の態様で実施できる。

(定量的PCR法によるプロモーターの発現解析)

- 乳酸生産能をもつ組換え酵母として、特開2003-259878号公報(特願2002-65879号)で作製した組換え酵母を用い、中和条件下(pH4.0～pH8.0)で乳酸発酵を行い、発酵開始6時間後と、30時間後の菌体を採取し、これよりRNAを調整した。RNAの調整にはRNeasy Miniキット(キアゲン社製)を用いた。得られたRNAをファーストストランドcDNA合成キット(ロシュ・ダイアグノスティックス社製)に従って、cDNA合成を行った。なお、使用した前記組換え酵母は、酵母IFO2260株(社団法人発行研究所登録株)のトリプトファン合成欠損株を10mlYPD培地にて30℃で対数増殖期まで培養を行い、集菌およびTEバッファーによる洗浄を行い、ついで、0.5mlTEバッファーと0.5mM酢酸リチウムを加え、30℃で振盪培養を行った後に、後述するpBT_{rp}-PDC1-LDHKCBベクターを制限酵素ApaIおよびSacI(いずれも宝酒造製)で処理して添加し、得られたコロニーをトリプトファン選択培地にて培養して安定性が確認できた選抜株

について安定したトリプトファン合成能と所定の染色体位置への前記DNA断片の導入を確認した株として取得することができる。

上記試料と、標的遺伝子のプライマー、およびライトサイクラーDNAマスターSYBRグリーンI(ロシュ・ダイアグノスティックス社製)を混合させた後、
5 定量的PCR解析装置 ライトサイクラー(ロシュ・ダイアグノスティックス社製)によって発現解析を行った。詳細は付属のプロトコールに従い行った。また、各遺伝子断片量4fM、20fM、100fMを同様にセットし、これをコントロールとして発現量の測定を行った。

合計で28種類の遺伝子発現について解析を行った。その中で最終的に有効な発現を確認できた高発現候補プロモーター6種類について、使用したプライマー配列とライトサイクラーで解析した際のT_m値を示す。なお、高発現するコントロールプロモーターとして、PDC1遺伝子プロモーター、TDH3遺伝子プロモーターについても解析した。これらのコントロールプロモーターについても、同様にプライマー配列とT_m値を示す。

15

=HOR7遺伝子の発現確認用プライマー= T_m値; 60°C

5' - CGT CGC CTT CAC TGG TTT AG - 3' (配列番号: 10)

5' - CAA AAA GGC CAA AGC ACC AG - 3' (配列番号: 11)

=TDH2遺伝子の発現確認用プライマー= T_m値; 57°C

5' - CAA GGT AAG TTG ACC GGT ATG - 3' (配列番号: 12)

5' - GAT GGA AGA GTT AGA GTC ACC C - 3' (配列番号: 13)

=HXT7遺伝子の発現確認用プライマー= T_m値; 57°C

25

5' - TCA TGG GCT GTT TGG TCT TC -3' (配列番号:14)

5' - AGC GTC GTA GTT GGC ACC TC -3' (配列番号:15)

5 =HSP30遺伝子の発現確認用プライマー= T_m値;57℃

5' - AAT TGC AGT CAG CCG TGA TG -3' (配列番号:16)

5' - TCG ACA GCT TGC TCT GCT TC -3' (配列番号:17)

10 =AHP1遺伝子の発現確認用プライマー= T_m値;60℃

5' - AAC CAA GCG TGG GCT AAG AG -3' (配列番号:18)

5' - GGT TTC CTT GGC AGC GTA AG -3' (配列番号:19)

15 =MRH1遺伝子の発現確認用プライマー= T_m値;57℃

5' - GCT GCC TGT GTT CAC TCC AC -3' (配列番号:20)

5' - TGG CTG CAA AAC GTT ACC AC -3' (配列番号:21)

20 =PDC1遺伝子の発現確認用プライマー= T_m値;60℃

5' - CAA CGA ATT GAA CGC TGC TTA C -3' (配列番号:22)

5' - ATT CAA CGG CTT CCT TAA CTT CTG -3' (配列番号:23)

25 =TDH3遺伝子の発現確認用プライマー= T_m値;57℃

5' - GTT TTC AAG GAA TTA GAC ACT GC -3' (配列

番号:24)

5' - CAA CAG TCT TTT GAG TAG CAG TC -3' (配列

番号:25)

- 5 定量的PCRの結果、HOR7遺伝子プロモーター、TDH2遺伝子プロモーター、HXT7遺伝子プロモーター、HSP30遺伝子プロモーター、AHP1遺伝子プロモーター、MRH1遺伝子プロモーターが選択された。乳酸生産酵母におけるこれらの遺伝子は、PDC1遺伝子やTDH3遺伝子発現と比較して、高い発現を示していた。これらの結果を図1に示す。また、これら
- 10 の遺伝子は、いずれも非組換え株における発現量よりも高い発現量を示すことができる。以上のことから、これらの遺伝子は、有機酸の存在下において、誘導的に発現されるプロモーターによって発現が活性化されていることがわかった。

15 実施例2

(プロモーターの取得と塩基配列決定)

- 実施例1において有効な発現を示した高発現候補プロモーターとして、6種類の遺伝子のプロモーター(HOR7遺伝子プロモーター、TDH2遺伝子プロモーター、HXT7遺伝子プロモーター、HSP30遺伝子プロモーター、
- 20 AHP1遺伝子プロモーター、MRH1遺伝子プロモーター)を選び、これらの遺伝子断片をクローニングした。またプロモーター評価のコントロールとして、高発現プロモーターとして知られるPDC1遺伝子プロモーター、TDH3遺伝子プロモーターも取得した。

- プロモーター取得における当該遺伝子資源としては、酵母IFO2260株
- 25 (社団法人・発酵研究所に登録されている菌株)のゲノムDNAを鋳型とするPCR増幅法によって単離した。本株をYPD培養液2mlで一晩培養し、

これにゲノムDNA調整キット、GenとるくんTM-酵母用-（タカラバイオ社製）を用いて、ゲノムDNAを調整した。また、調整したゲノムDNAは、分光光度計Urtro spec 3000（Amersham Pharmacia Biotech社製）によりDNA濃度を測定した。

- 5 PCR反応には増幅酵素として、増幅断片の正確性が高いとされるKOD plus DNA polymerase（東洋紡社製）を使用した。調製した酵母IFO2260株のゲノムDNA 50ng、プライマーDNA 50pmol×2、10倍濃縮KOD酵素反応用バッファー 5 μ l、25mM MgSO₄ 2 μ l、2mM dNTPmix 5 μ l、KOD plus DNA polymerase 1.0ユニットを
- 10 加えた合計で50 μ lの反応溶液を、PCR増幅装置Gene Amp PCR system 9700（PE Applied Biosystems社製）によってDNA増幅した。PCR増幅装置の反応条件は、96℃ 2分の熱処理を行った後、96℃で30秒、53℃で30秒、72℃で60秒の3つの温度変化を1サイクルとし、これを25サイクル繰り返し、最後に4℃とした。本反応試料5 μ lを1% TBE
- 15 アガロースゲル（0.5 μ g/mlのエチジウムブロマイド含有）にて電気泳動し、本ゲルを254nmの紫外線照射（フナコシ社製）によってDNAのバンドを検出し、遺伝子増幅の確認を行った。

プライマー配列は以下の通りとした。

- 20 =HOR7遺伝子プロモーター増幅用プライマー=
HOR7P-U（35mer、T_m値 72.6℃、末端に制限酵素NotIサイトを付加）
- 5' - ATA TAT GCG GCC GCT CGC AGC CAC GGG
TCA ACC CG -3'（配列番号：26）
- 25 HOR7P-D（41mer、T_m値 53.7℃、末端に制限酵素SpeIサイトを付加）

5' - ATA TAT ACT AGT TTT TAT TAT TAG TCT T
TT TTT TTT TTG AC -3' (配列番号:27)

=TDH2遺伝子プロモーター増幅用プライマー=

- 5 TDH2P-U (39mer、T_m値 67.1℃、末端に制限酵素NotIサイトを
付加)

5' - ATA TAT GCG GCC GCT TGA CGG GTA TTC
TGA GCA TCT TAC -3' (配列番号:28)

- 10 TDH2P-D (38mer、T_m値 56.5℃、末端に制限酵素SpeIサイトを
付加)

5' - TAT ATA CTA GTT TGT TTT GTT TGT TTG T
GT GAT GAA TT -3' (配列番号:29)

=HXT7遺伝子プロモーター増幅用プライマー=

- 15 HXT7P-U (33mer、T_m値 68.4℃、末端に制限酵素NotIサイトを
付加)

5' - ATA TAT GCG GCC GCC CTG CTA AAC ACG
CCC TAC -3' (配列番号:30)

- 20 HXT7P-D (40mer、T_m値 52.5℃、末端に制限酵素SpeIサイトを
付加)

5' - ATA TAT ACT AGT TTT TGA TTA AAA TTA
AAA AAA CTT TTT G -3' (配列番号:31)

=HSP30遺伝子プロモーター増幅用プライマー=

- 25 HSP30P-U (34mer、T_m値 64.5℃、末端に制限酵素NotIサイトを
付加)

5' - ATA TAT GCG GCC GCT GAA TAC GTC CTG
TCA ATT C -3' (配列番号:32)

HSP30P-D (36mer、Tm値 54.0℃、末端に制限酵素SpeIサイトを
付加)

5 5' - ATA TAT ACT AGT TGA AAT TTG TTG TTT
TTA GTA ATC -3' (配列番号:33)

=AHP1遺伝子プロモーター増幅用プライマー=

10 AHP1P-U (35mer、Tm値 65.5℃、末端に制限酵素NotIサイトを
付加)

5' - ATA TAT GCG GCC GCA TCC GAA TTC AAT
GTA GCA CC -3' (配列番号:34)

AHP1P-D (37mer、Tm値 58.6℃、末端に制限酵素SpeIサイトを
付加)

15 5' - ATA TAT ACT AGT GTT TTG TTG TGG TTA
TTG GTA GTA C -3' (配列番号:35)

=MRH1遺伝子プロモーター増幅用プライマー=

20 MRH1P-U (47mer、Tm値 71.1℃、末端に制限酵素NotIサイトを
付加)

5' - AGC TAG CTA GCG GCC GCG ATG GAA GAT
GCA ACT TGC AAA TGT AGT CC -3' (配列番号:36)

MRH1P-D (47mer、Tm値 64.1℃、末端に制限酵素SpeIサイトを
付加)

25 5' - AGC TAG CTA CTA GTG TTA TTT TTC TTC
TTT GTT CTG TGG GTT AAA GG -3' (配列番号:37)

=TDH3遺伝子プロモーター増幅用プライマー(コントロール)=

TDH3P-U (42mer、T_m値 69.5℃、末端に制限酵素NotIサイトを
付加)

5 5' - AGC TAG CTA GCG GCC GCG TTG AAT GTT
AGC GTC AAC AAC AAG -3' (配列番号:38)

TDH3P-D (47mer、T_m値 62.3℃、末端に制限酵素SpeIサイトを
付加)

10 5' - AGC TAG CTA CTA GTT TGT TTG TTT ATG
TGT GTT TAT TCG AAA CTA AG -3' (配列番号:39)

=PDC1遺伝子プロモーター増幅用プライマー(コントロール)=

PDC1P-U (42mer、T_m値 67.1℃、末端に制限酵素NotIサイトを
付加)

15 5' - AGC TAG CTA GCG GCC GCG TTG AAT GTT
AGC GTC AAC AAC AAG -3' (配列番号:40)

PDC1P-D (37mer、T_m値 56.4℃、末端に制限酵素SpeIサイトを
付加)

20 5' - TAT ATA CTA GTT TGA TTG ATT TGA CTG
TGT TAT TTT G -3' (配列番号:41)

取得したPCR断片を、pBluescriptII SK+ベクター(東洋紡社製)へ
サブクローニングした。一連の反応操作は、一般的なDNAサブクローニ
グ法に準じて行った。すなわち、制限酵素NotIおよびSpeI(いずれもタカ
25 ラバイオ社製)処理した上記ベクターに、同様の制限酵素で処理した各プ
ロモーター断片をT4 DNA Ligaseによって連結した。T4 DNA Liga

se反応には、LigaFast Rapid DNA Ligation(プロメガ社製)を用い、詳細は付属のプロトコールに従った。

- 次に、ligation反応液を大腸菌コンピテント細胞に導入して大腸菌を形質転換した。大腸菌コンピテント細胞はJM109株(東洋紡社製)を使用し、
- 5 詳細な取り扱いには付属のプロトコールに従った。抗生物質アンピシリン100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を含有したLBプレート下でコロニー選抜を行い、各選抜コロニーからプラスミドDNAを調整し、これに配列番号:26~41に記載のプライマーDNAを用いてコロニーPCRで確認することにより、それぞれのプロモーター配列をサブクローニングした。なお、エタノール沈殿処理、制限酵素処理等の一連操作の詳細なマニュアルは、Molecular Cloning ~A
- 10 Laboratory Manual second edition~(Maniatis et al., Cold Spring Harbor Laboratory press. 1989)に従った。

- 単離したプロモーター配列を含む各ベクターを、アルカリ抽出法によって調製し、これをGFX DNA Purification kit (Amersham Pharmacia
- 15 Biotech 社製)にてカラム精製した。次に、分光光度計Ultro spec 3000(Amersham Pharmacia Biotech社製)にてDNA濃度を測定し、DNA塩基配列キットBigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Applied Biosystems 社製)に従ってシーケンシング反応を行った。反応試料を塩基配列解析装置ABI PRISM 310 Genetic
- 20 Analyzer (PE Applied Biosystems 社製)にセットし、6種類のプロモーターの塩基配列を決定した。なお、機器の使用方法の詳細は本装置付属のマニュアルに従った。配列解析によって決定したDNA配列を配列番号:1~6に示す。

25 実施例3

(組換えベクターの構築)

新たに構築したこの染色体導入型ベクターをそれぞれ、pBTRP-HOR
7P-LDHベクター、pBTRP-TDH2P-LDHベクター、pBTRP-HXT
7P-LDHベクター、pBTRP-HSP30P-LDHベクター、pBTRP-AH
P1P-LDHベクター、pBTRP-MRH1P-LDHベクターと名付けた。ま
5 た、プロモーター比較のコントロールとして、TDH3遺伝子プロモーター、P
DC1遺伝子プロモーター下でL-LDH遺伝子が発現可能なベクターにつ
いても構築し、これをpBTRP-TDH3P-LDHベクター、pBTRP-PDC
1P-LDHベクターと名づけた。以下に、本実施例におけるベクター構築
工程の詳細を図2及び図3に基づいて説明するが、ベクター構築の手順は
10 これに限定されるものではない。なお、ベクター構築における一連の反応操
作は、一般的なDNAサブクローニング法に準じて行い、一連の酵素類は
タカラバイオ社製のものを使用した。

(プレベクターの構築)

一般的なDNAサブクローニング法に従って、プレベクターpBTRP-LD
15 Hの構築を行った。本発明者らが既に構築したpBTrp-PDC1-LDHK
CBベクター(特開2003-259878号公報に記載)を制限酵素ApaI、Pst
tI処理して得られた断片を、同様の制限酵素で処理したpBluescriptII
SK+ベクター(東洋紡社製)に導入し、pBTRP-PDC1Dベクターを構
築した。続いて本ベクターに、PCR増幅によって取得し、これを制限酵素S
20 acI、NotI処理したTRX1断片(700bp)、PCR増幅によって取得し、これ
を制限酵素SpeI、BamHI処理したLDHKCB断片(2000bp)を順次連
結し、プレベクターpBTRP-LDHを構築した。

なお、pBTrp-PDC1P-LDHKCBベクターは、以下の方法で構築し
たものである。すなわち、高等真核生物であるウシ由来のタンパク質である
25 L-乳酸脱水素酵素を、酵母サッカロマイセス・セレビシエ属において効率
的に生産するために、ウシ由来L-乳酸脱水素酵素のアミノ酸配列をコー

ドするDNAに対して、以下の項目を設計指針として、天然にない新規な遺伝子配列(配列番号:42)を設計し、長鎖DNAの合成方法として知られている藤本らの手法(藤本英也、合成遺伝子の作製法、植物細胞工学シリーズ7植物のPCR実験プロトコール、1997、秀潤社、p95-100)を用いて該DNAを合成した(合成したDNAをLDHKCB配列と称した)。全合成したLDHKCB配列を用いて、酵母染色体導入型ベクターpBTRP-PDC1-LDHKCBを構築した(図2右上参照)。なお、LDHKCB配列をEcoRIにて酵素処理し、同様に、EcoRIにて酵素処理したpCR2.1TOP OVector(Invitrogen)に常法により連結し、pBTOPO-LDHKCBベクターと称した。

1. pBTrp-PDC1-LDHKCB構築のためのPDC1P断片は、サッカロマイセス・セレビシエ YPH 株(Stratagene 社)のゲノムDNAを鋳型として使用した PCR 増幅法によって単離を行った。サッカロマイセス・セレビシエ YPH 株のゲノムDNAは、ゲノム調製キットである Fast DNA Kit(Bio 101 社)を用い、詳細は、附属のプロトコールに従い、調製した。DNA濃度は分光光度計Ultro spec 3000(Amersham Pharmacia Biotech社)にて測定した。PCR 反応には、増幅酵素として、増幅断片の正確性が高いとされる Pyrobest DNA Polymerase(宝酒造)を使用した。

上記手法にて調製したサッカロマイセス・セレビシエYPH株のゲノムDNA50ng/サンプル、プライマーDNA50pmol/サンプル、及びPyrobest DNAPolymerase0.2ユニット/サンプルを合計で50 μ lの反応系に調製した。反応溶液を、PCR増幅装置 Gene Amp PCRsystem 9700(PE Applied Biosystems社)によってDNA増幅を行った。PCR増幅装置の反応条件は、96℃で2分の熱処理を行った後、96℃で30秒と、53℃で30秒と、72℃で60秒との3つの温度変化を1サイクルとし、これを25サイ

クル行い、その後4℃とした。PDC1プライマーの増幅断片を1%TBEアガロースゲル電気泳動にて遺伝子増幅断片の確認を行った。なお反応に使用したプライマーDNAは、合成DNA(サフデーテクノロジー社)を用い、このプライマーのDNA配列は以下の通りであった。

5 ・PDCIP-LDH-U(31mer, Tm値58.3℃)末端に制限酵素BamHI
 サイトを付加:ATA TAT GGA TCC GCG TTT ATT TAC CTA
 TCT C(配列番号:44)

 ・PDCIP-LDH-D(31mer, Tm値54.4℃)末端に制限酵素EcoRIサ
 イトを付加:ATA TAT GAA TTC TTT GAT TGA TTT GAC T
10 GT G(配列番号:45)

2. 遺伝子断片であるPDC1遺伝子のプロモーター断片(PDCIP)971bp
と、PDC1遺伝子下流領域断片(PDC1D)518bpは、上述のように、サッ
カロマイセス・セレビシエYPH株のゲノムDNAを鋳型として使用したPCR
増幅法によって単離を行った。PCR増幅の手順は上記の通りであるが、P
15 DC1遺伝子下流領域断片の増幅には、以下のプライマーを使用した。

 ・PDC1D-LDH-U(34mer, Tm値55.3℃)末端に制限酵素XhoIサ
 イトを付加:ATA TAT CTC GAG GCC AGC TAA CTT CTT G
 GTCGAC(配列番号:46)

 ・PDC1D-LDH-D(31mer, Tm値54.4℃)末端に制限酵素ApaIサ
20 イトを付加:ATA TAT GAA TTC TTT GAT TGA TTT GAC T
 GT G(配列番号:47)

3. 上記反応にて取得したPDC1P及びPDC1D各遺伝子増幅断片をそ
れぞれ、エタノール沈殿処理によって精製した後、PDC1P増幅断片を制
限酵素BamHI/EcoRI及びPDC1D増幅断片を制限酵素XhoI/ApaI
25 にて制限酵素反応処理を行った。なお、以下に用いた酵素類はすべて宝
酒造社製のものを用了。また、エタノール沈殿処理、制限酵素処理の一

連操作の詳細なマニュアルはMolecularCloning A Laboratory Manual second editlon(Maniatis et al. , Cold Spring Harbor Laboratorypress. 1989)に従った。制限酵素BamHI/EcoRI(宝酒造社)及び脱リン酸化酵素Alkaline Phosphatase(BAP、宝酒造社)を施したpBluescriptII SK+ベクター(東洋紡社)に、上記PCR法にて増幅し制限酵素処理を施したPDC1P断片をT4DNA Ligase反応によって連結させた。T4 DNA Ligase反応には、LigaFast Rapid DNA LigationSystem(プロメガ社)を用い、詳細は付属のプロトコールに従った。

- 10 4. 次にLigation反応を行った溶液を用いて、コンピテント細胞への形質転換を行った。コンピテント細胞は大腸菌JM109株(東洋紡社)を用い、詳細は付属のプロトコールに従って行った。得られた培養液は抗生物質アンピシリン100 μ g/mlを含有したLBプレートにまいて一晚培養した。生育したコロニーにつき、インサート断片のプライマーDNAを用いたコロニーPCR法による確認、及びミニプレップによるプラスミドDNA調製溶液に対する制限酵素処理による確認を行い、ベクターpBPDC1Pを単離した。

- 15 5. ついで、先に構築されたpBTOPO-LDHKCBベクターを制限酵素EcoRI処理及び末端修飾酵素T4DNA polymerase処理することで得られるLDHKCB遺伝子断片を、同じく制限酵素EcoRI処理、末端修飾酵素T4DNA polymerase処理を行ったpBPDC1Pベクター中に、上述と同様の操作でサブクローニングを行い、pBPDC1P-LDHKCBベクターを作製した。

- 20 6. 一方、既に構築されたpYLDIベクターを制限酵素EcoRI/AatII処理及び末端修飾酵素T4DNAPolymerase処理することで得られるLDH遺伝子(ビフィドバクテリウム・ロンガム由来)断片を、同じく制限酵素EcoRI処理、末端修飾酵素T4DNA polymerase処理を行ったpBPDC1Pベ

クター中に、上述と同様の操作でサブクローニングを行い、pBPDC1P-LDH1ベクターを作製した。なお、上記のpYLD1ベクターは大腸菌に導入され(名称:「E. coli pYLD1」)、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター(茨城県つくば市東1丁目1番地1)に、受託番号FE
5 RMBP-7423としてブダベスト条約に基づき国際寄託されている(原寄託日:平成11(1999)年10月26日)。

7. 続いて、このベクターをXhoI/ApaI処理し、同様に制限酵素処理を施した増幅PDC1D断片を連結させてpBPDC1P-LDHベクターを作製した。最後にpBPDC1P-LDHIIベクターをEcoRV処理したものに、pRS
10 404ベクター(Stratagene社)をAatII/SspI処理、T4DNAPolymerase処理して得られたTrpマーカ断片を連結させて、pBTrp-PDC1-LDHベクターを構築した。

8. 次に、pBPDC1P-LDHKCBベクターをApaI/EcoRIにて制限酵素処理し、一方、pBTrp-PDC1-LDHベクターを、制限酵素ApaIおよび
15 StuIで処理したTrpマーカを含む断片に処理し、増幅させた断片を連結させて、最終コンストラクトである染色体導入型pBTrp-PDC1-LDHKCBベクターを構築した。

(最終ベクターの構築及び確認)

プレベクターpBTRP-LDHを制限酵素NotI、SpeI処理し、これに上記
20 実施例2において取得したプロモーター配列を同様の制限酵素にて処理後、それぞれ連結させた最終ベクターを作製した。今回作製したpBTRP-HOR7P-LDHベクター、pBTRP-TDH2P-LDHベクター、pBTRP-HXT7P-LDHベクター、pBTRP-HSP30P-LDHベクター、pBTRP-AHP1P-LDHベクター、pBTRP-MRH1P-LDHベクター、および
25 比較コントロールとして作製したpBTRP-TDH3P-LDHベクター、pBTRP-PDC1P-LDHベクターについての詳細なマップを図4~11に示

す。

なお、上記の一連のDNA連結反応は、LigaFast Rapid DNA Ligation(プロメガ社製)を用い、詳細は付属のプロトコールに従った。また、Ligation 反応溶液のコンピテント細胞への形質転換には、大腸菌J
5 M109株(東洋紡社製)を使用した。いずれの場合も、抗生物質アンピシリン100 μ g/mlを含有したLBプレート下でコロニー選抜を行い、各コロニー用いたコロニーPCRを行うことで、目的のベクターであるかを確認した。なお、エタノール沈殿処理、制限酵素処理等の一連操作の詳細なマニュアルは、Molecular Cloning "A Laboratory Manual second edition"
10 (Maniatis et al., Cold Spring Harbor Laboratory press. 1989)に従った。

実施例4

(形質転換酵母の作製)

15 宿主である酵母IFO2260株(社団法人・発酵研究所に登録されている菌株)のトリプトファン合成能を欠損した株をYPD培養液10mlにて、30℃で対数増殖期(OD600nm=0.8)まで培養した。これにFrozen-EZ Yeast TransformationIIキット(ZYMO. RESEARCH社製)を用いてコンピテントセルを作製した。キット添付のプロトコールに従い、このコンピテ
20 ントセルに上述の実施例4にて構築した染色体導入型ベクターを制限酵素PvuII処理し、遺伝子導入した。なお、具体的な導入ベクターは、pBTRP-HOR7P-LDHベクター、pBTRP-TDH2P-LDHベクター、pBTRP-HXT7P-LDHベクター、pBTRP-HSP30P-LDHベクター、pBTRP-AHP1P-LDHベクター、pBTRP-MRH1P-LDHベクター、および比較コントロールとして作製したpBTRP-TDH3P-LDHベクター、p
25 BTRP-PDC1P-LDHベクターの8種類である。これらの形質転換試料

を洗浄後、100 μ lの滅菌水に溶解させてトリプトファン選抜培地に塗抹し、それぞれについて30℃静置培養下で形質転換体の選抜を行った。

- 得られたそれぞれのコロニーを新たなトリプトファン選抜培地で再度単離し、生育能を安定に保持している株を形質転換候補株とした。次に、これらの候補株をYPD培養液2mlで一晩培養し、これにゲノムDNA調製キット、GenとるくんTMー酵母用ー(タカラバイオ社製)を用いてゲノムDNAを調製した。調整した各ゲノムDNAを鋳型にPCR解析を行い、導入遺伝子の有無が確認できたものを形質転換株とした。それぞれの形質転換酵母株における、染色体中の導入遺伝子の構造を図12～19に示す。

10

実施例5

(発酵試験による各プロモーターの検証)

- 作製した形質転換体におけるL-乳酸生産量を測定し、高発現プロモーターとして知られるTDH3遺伝子プロモーター及びPDC1プロモーターを用いた乳酸生産量と比較することで、取得した6種類のプロモーターの活性(有機酸存在下での)を検証した。得られた8種類の形質転換酵母をYPD液体培地5mlに植菌し、30℃、130rpmで一晩、振盪培養を行い、OD600nm=1.2のものを初発菌体とした。このうちの2mlを10%グルコース含有YPD培養液20ml、および10%相当のショ糖を含有したケーンジューズ培養液20mlにそれぞれ植菌し(全量22ml)、中和剤として炭酸カルシウム(ナカライテスク社製)1gを添加したものを、30℃、4日間で静置培養した。乳酸生産量の測定には、多機能バイオセンサBF-4装置(王子計測機器社製)を用い、仕様の詳細は付属のマニュアルに従った。これらの結果を図20及び図21に示す。

- 図20及び図21に示すように、HOR7遺伝子プロモーター、TDH2遺伝子プロモーター、及びHXT7遺伝子プロモーターについては、対照としたP

- DC1プロモーター及びTDH3プロモーターと比較して同等あるいはそれ以上の発現強度を確認できた。また、HSP30遺伝子プロモーター、AHP1遺伝子プロモーター及びMRH1遺伝子プロモーターについては、対照と比較して高い発現強度を確認することができなかったが、これらのプロモーターについては、乳酸生産量が少ないためにプロモーターによる発現強度が高まっていない状態にあると考えられ、培養系に対し外部添加にて乳酸等の有機酸を添加するか、あるいは構成的プロモーターにより乳酸を発現させることにより、高い発現強度を確認できるであろうと思われた。
- 5

10 配列表フリーテキスト

配列番号: 10~41 合成プライマー

配列番号: 42、43 合成DNA

配列番号: 44~47 合成プライマー

請求の範囲

1. 以下の(a)～(c)のいずれかに記載の塩基配列を有し、有機酸存在下での発現用プロモーターであるDNA。
- 5 (a) 配列番号：1～6のいずれかに記載の塩基配列からなるDNA。
(b) 配列番号1～6のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNA。
(c) 配列番号：1～6のいずれかに記載の塩基配列において1あるいは2以上の塩基が置換、欠失、付加、及び／又は挿入された配列からなるDNA。
- 10 A。
2. 前記1に記載のDNAの一部であって、有機酸存在下での発現用プロモーターであるDNA。
3. サッカロマイセス属酵母の高浸透圧応答7遺伝子(HOR7遺伝子)、グリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素2遺伝子(TDH2遺伝子)、熱ショックタンパク質30遺伝子(HSP30遺伝子)、ヘキソース輸送タンパク質7遺伝子(HXT7遺伝子)、チオレドキシンペルオキシダーゼ1遺伝子(AHP1遺伝子)、及び膜タンパク質1関連遺伝子(MRH1遺伝子)のいずれかの遺伝子のプロモーター活性を有し、有機酸存在下での発現用プロモーターであるDNA。
- 15
4. 有機酸生産のためのDNAの発現用である、前記1～3のいずれかに記載のDNA。
- 20
5. 前記有機酸は乳酸である、前記4に記載のDNA。
6. 前記1～3のいずれかに記載のDNAを含む遺伝子組換え用DNA構築物。
- 25
7. 前記DNAに機能的に結合された有機酸生産に関与するタンパク質をコードするDNAを備える、前記6に記載のDNA構築物。

8. 前記有機酸生産に関与するタンパク質は乳酸脱水素酵素活性を有するタンパク質である、前記7に記載のDNA構築物。
9. 前記タンパク質は、ウシ由来の乳酸脱水素酵素である、前記8に記載のDNA構築物。
- 5 10. さらに、オートレギュレーション機構を備える酵母遺伝子に対する相同組換え用のDNAを備える、前記6～9のいずれかに記載のDNA構築物。
11. 前記酵母遺伝子は、ピルビン酸脱炭酸酵素1(PDC1)遺伝子である、前記10に記載のDNA構築物。
12. プラスミドベクター又はウイルスベクターである、前記6～11のいずれかに記載のDNA構築物。
- 10 13. 前記1～3のいずれかに記載のDNAを保持する形質転換体。
14. 前記DNAに機能的に結合された有機酸生産に関与するタンパク質をコードするDNAを備える、前記13に記載の形質転換体。
15. 前記有機酸生産に関与するタンパク質は、乳酸脱水素酵素活性を有するタンパク質である、前記14に記載の形質転換体。
- 15 16. 前記1～3のいずれかに記載のDNAと前記有機酸生産に関与するタンパク質をコードするDNAとは、宿主染色体上に組み込まれている、前記14又は15に記載の形質転換体。
17. 酵母である、前記13～16のいずれかに記載の形質転換体。
- 20 18. 前記1～3のいずれかに記載のDNA及び該DNAに対して機能的に結合された乳酸脱水素酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAを酵母染色体上に保持し、これらのDNAの少なくとも一部によってオートレギュレーション機構を備える酵母遺伝子が破壊されている、形質転換酵母。
- 25 19. 前記オートレギュレーション機構を備える酵母遺伝子は、ピルビン酸脱炭酸酵素1遺伝子である、前記18に記載の形質転換酵母。

20. 前記乳酸脱水素酵素活性を有するタンパク質は、ウシ由来の乳酸脱水素酵素である、前記19に記載の形質転換酵母。
21. 前記酵母はサッカロマイセス属に属するものである、前記18～20のいずれかに記載の形質転換酵母。
- 5 22. 前記1～3のいずれかに記載のDNAと該DNAの下流に機能的に結合された所定のタンパク質をコードするDNAとを保持する宿主細胞を使用する、目的遺伝子の発現方法。
23. 前記宿主細胞の培養系は有機酸を含有する、前記22に記載の方法。
- 10 24. 前記宿主は酵母であり、前記1～3のいずれかに記載のDNAと前記タンパク質をコードするDNAとを酵母染色体上に保持し、これらのDNAの少なくとも一部によってオートレギュレーション機構を備える酵母遺伝子が破壊されている、前記22又は23に記載の発現方法。
25. 前記タンパク質は、有機酸生産に関与するタンパク質である、前記24
- 15 に記載の発現方法。
26. 前記タンパク質は、乳酸脱水素酵素活性を有するタンパク質である、前記25に記載の方法。
27. 前記1～3のいずれかに記載のDNAと該DNAの下流に機能的に結合された有機酸生産に関与するタンパク質をコードするDNAとを保持する
- 20 形質転換酵母を使用する、有機酸の生産方法。
28. 前記有機酸は乳酸であり、前記タンパク質は、乳酸脱水素酵素活性を有するタンパク質である、前記27に記載の方法。
29. 前記DNAを酵母染色体上に保持し、これらのDNAの少なくとも一部によってピルビン酸脱炭酸酵素1遺伝子が破壊されている、前記27又は2
- 25 8に記載の生産方法。
30. 以下の(a)～(c)のいずれかに記載のプロモーター活性を有するDN

A。

(a) 配列番号：1～6のいずれかに記載の塩基配列からなるDNA。

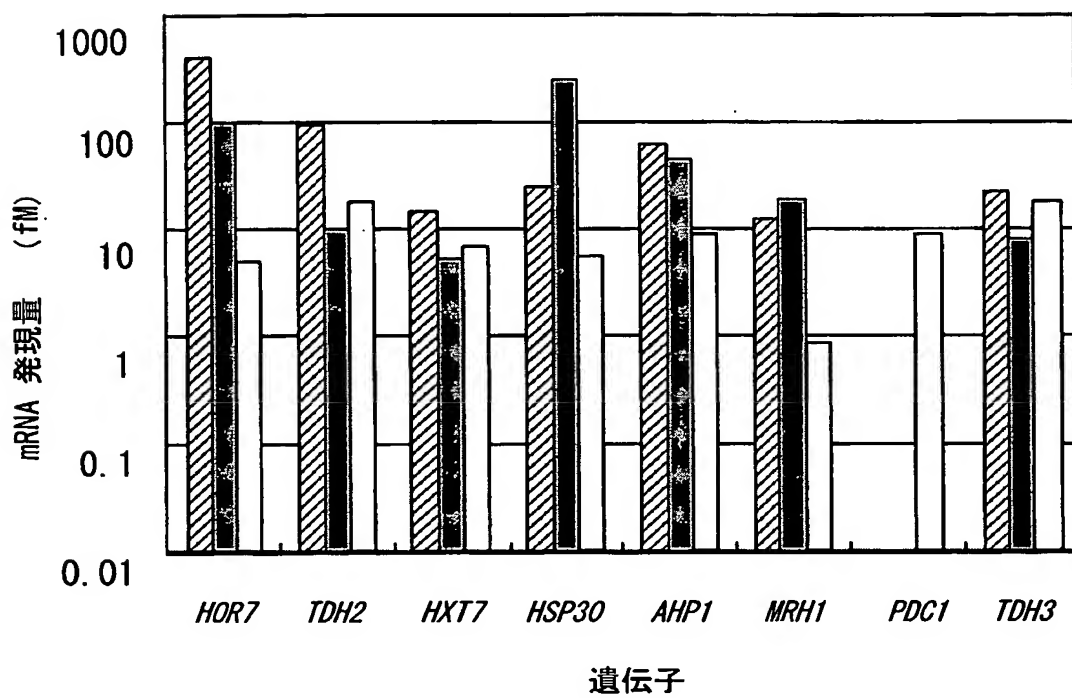
(b) 配列番号1～6のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA。

- 5 (c) 配列番号：1～6のいずれかに記載の塩基配列において1あるいは2以上の塩基が置換、欠失、付加、及び／又は挿入された配列からなるDNA。

31. 前記30に記載のDNAの少なくとも一部分を含み、プロモーター活性を有するDNA。

1/10

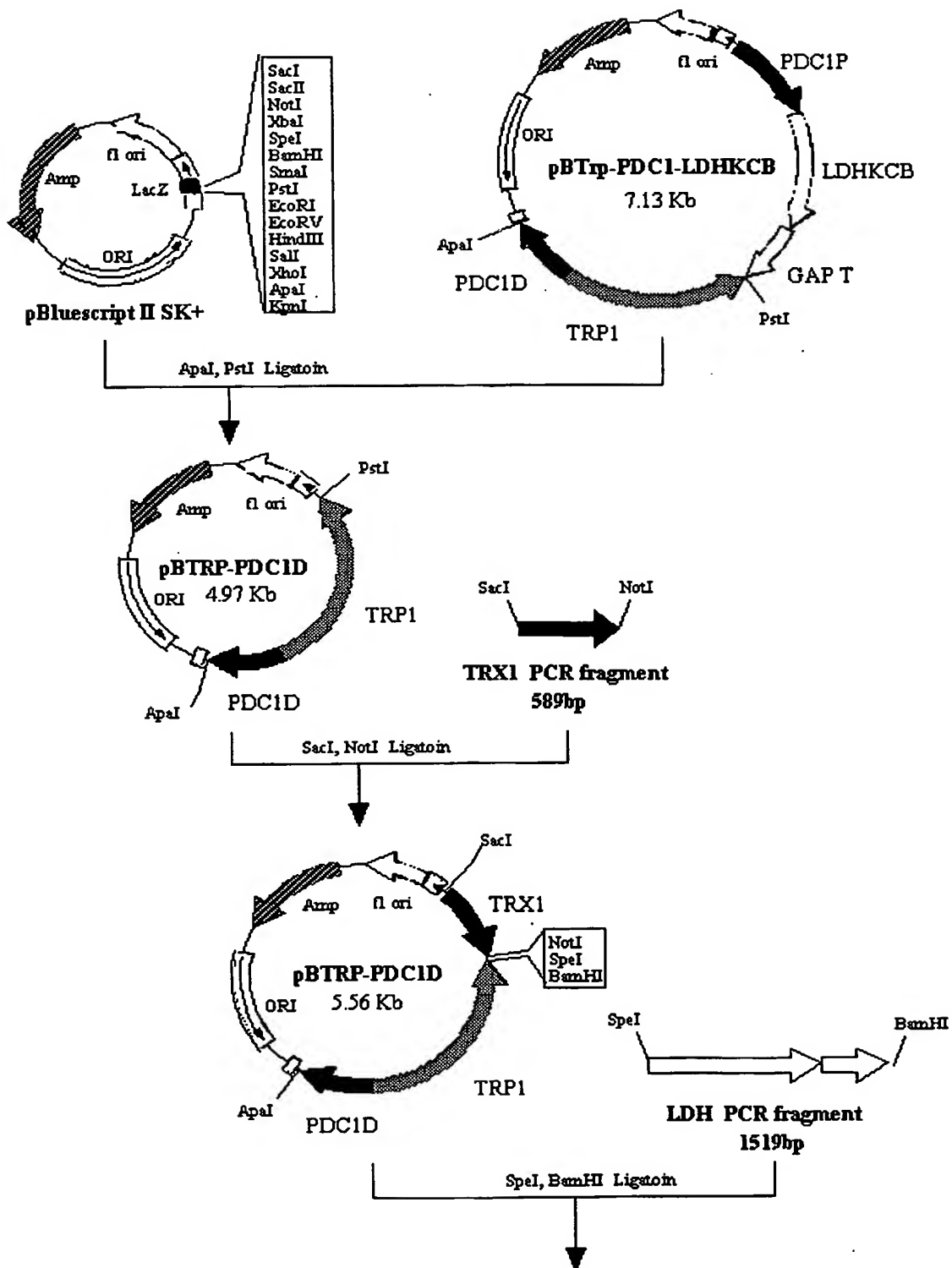
図1



遺伝子組み換え株	発酵開始6時間後
遺伝子組み換え株	発酵開始30時間後
非組み換え株 (IF02260株)	発酵開始6時間後

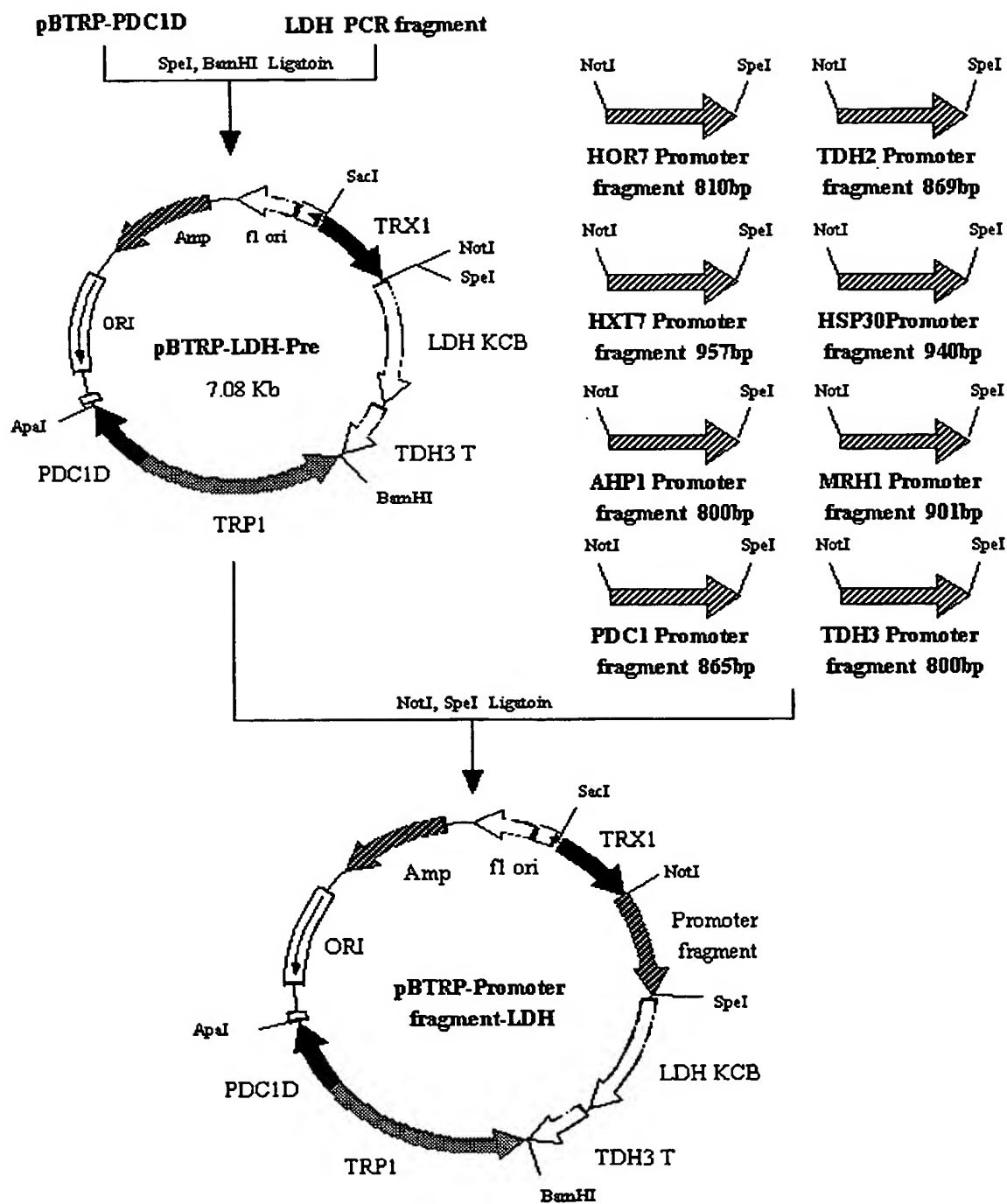
2/10

図2



3/10

図3



4/10

図4

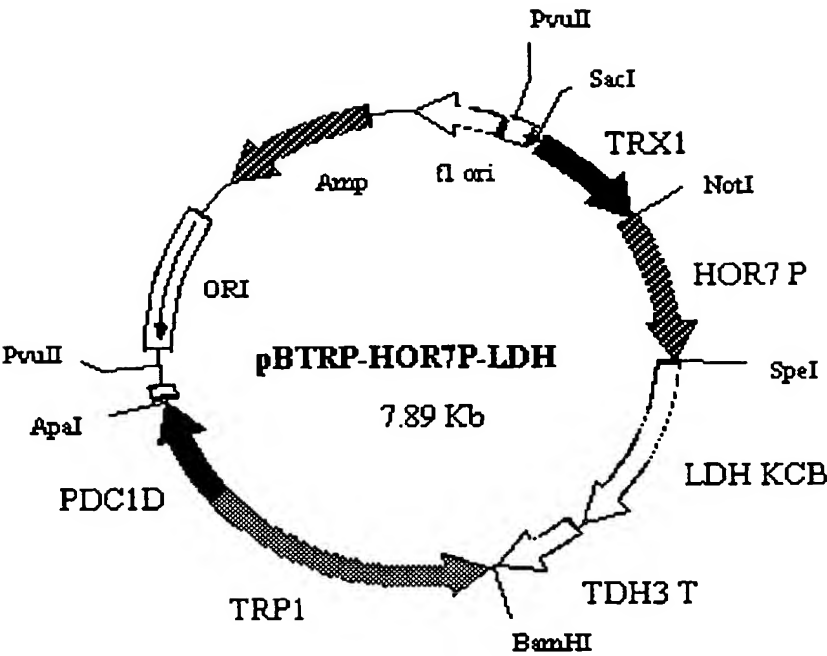
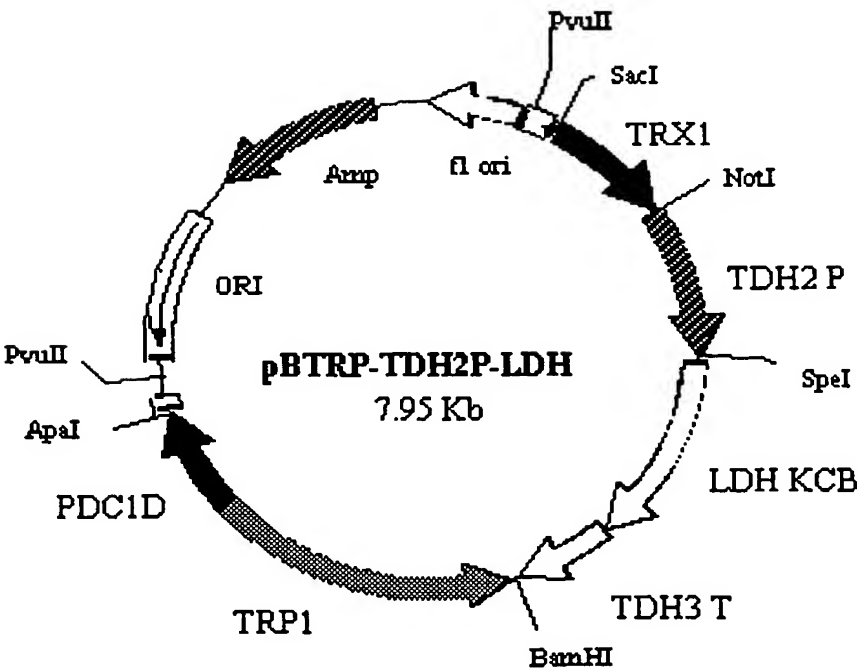


図5



5/10

図6

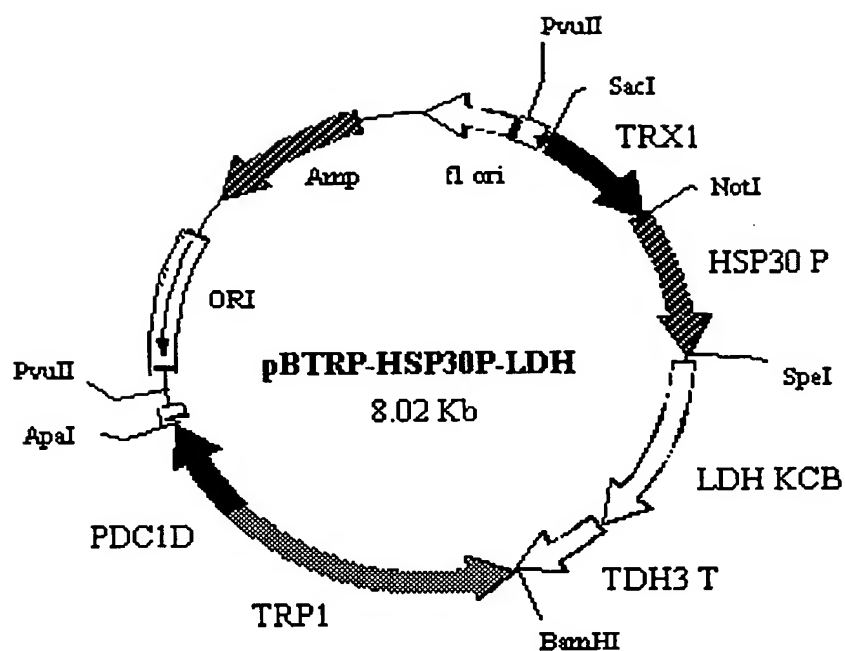
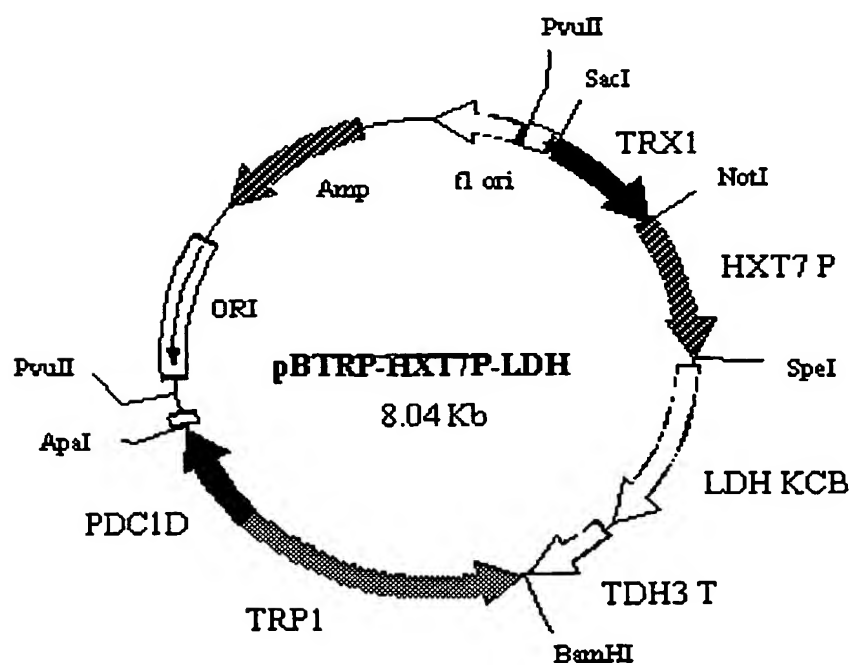


図7



6/10

図8

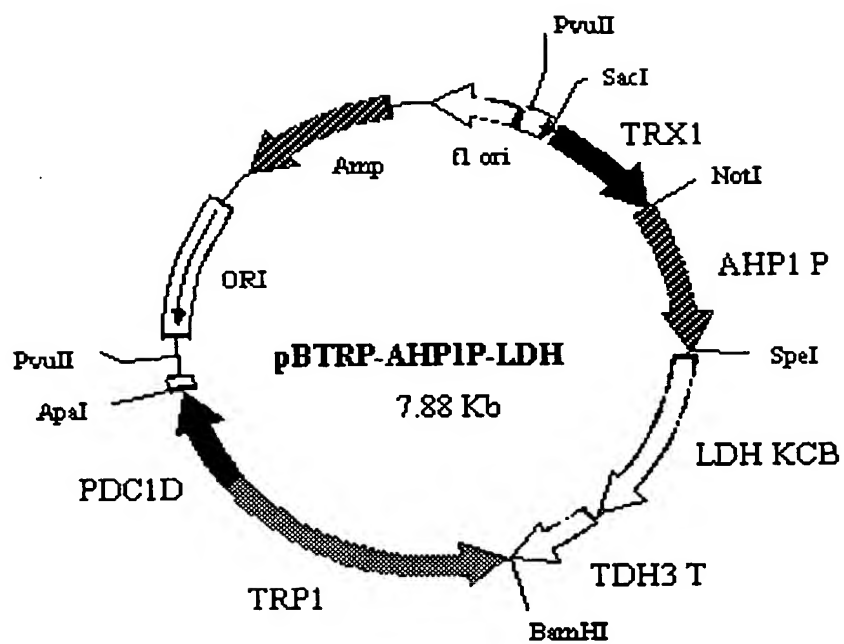
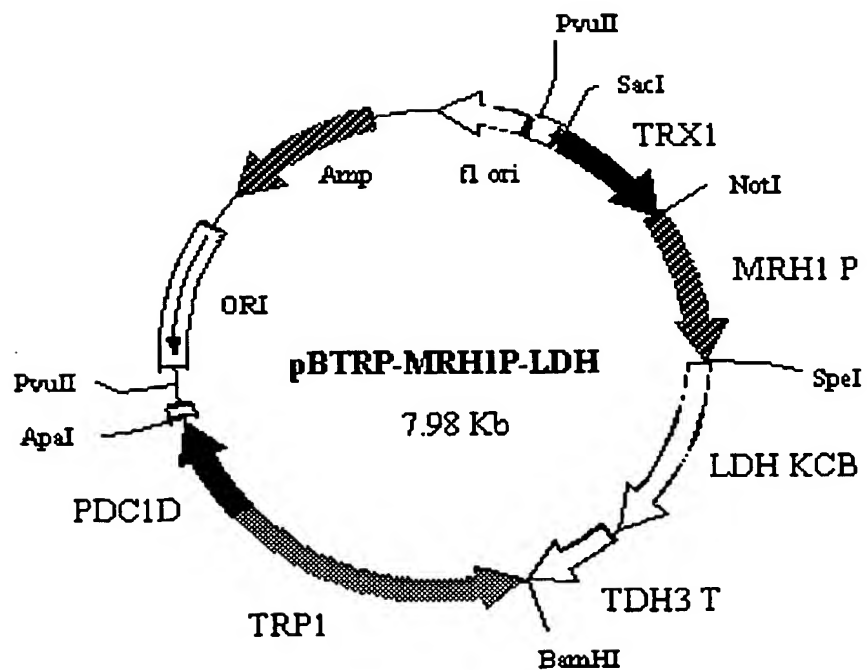


図9



7/10

図10

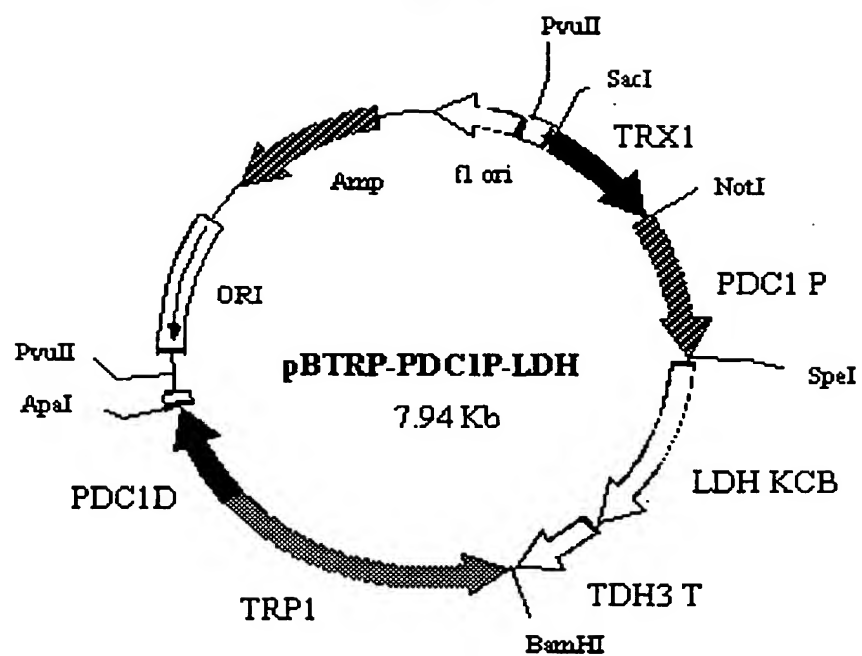
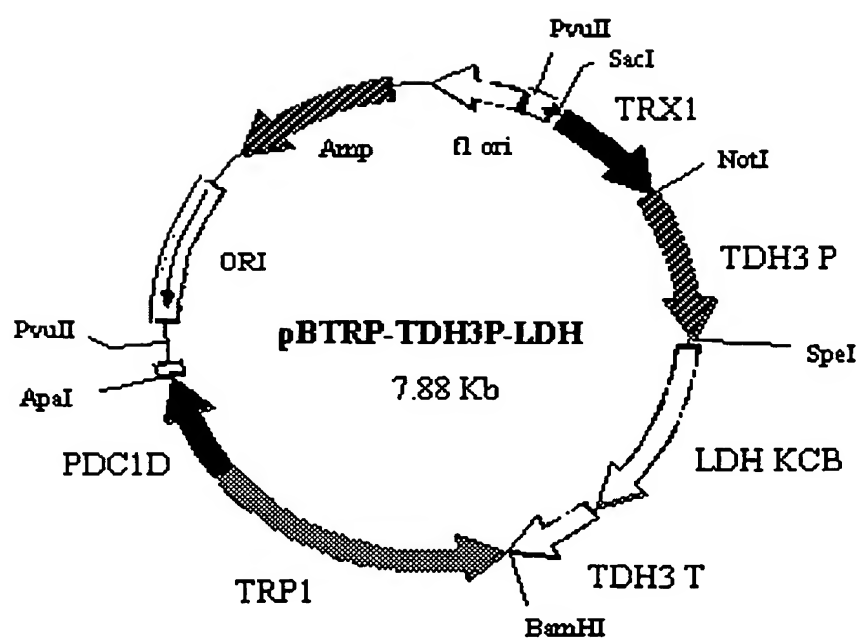


図11



8/10

図12

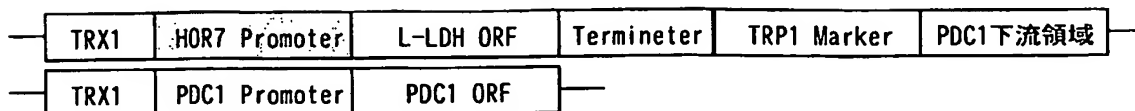


図13

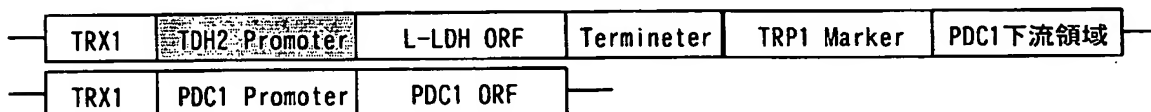


図14

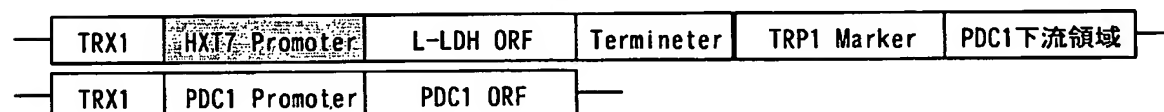


図15

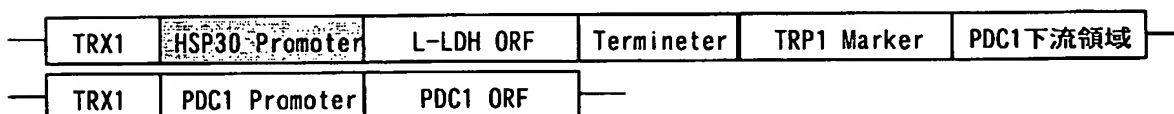


図16

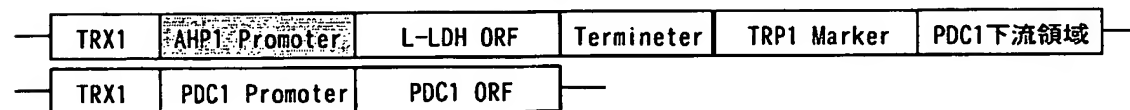


図17

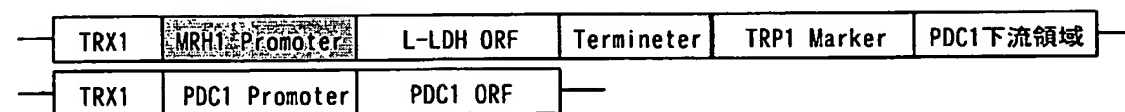
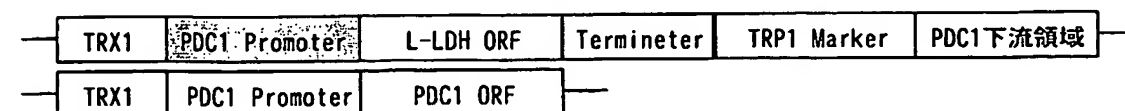


図18



9/10

図19

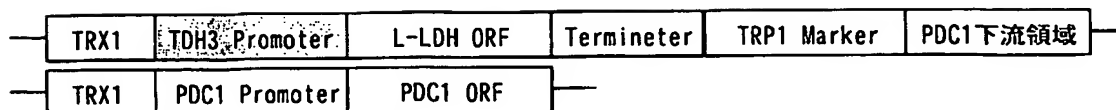
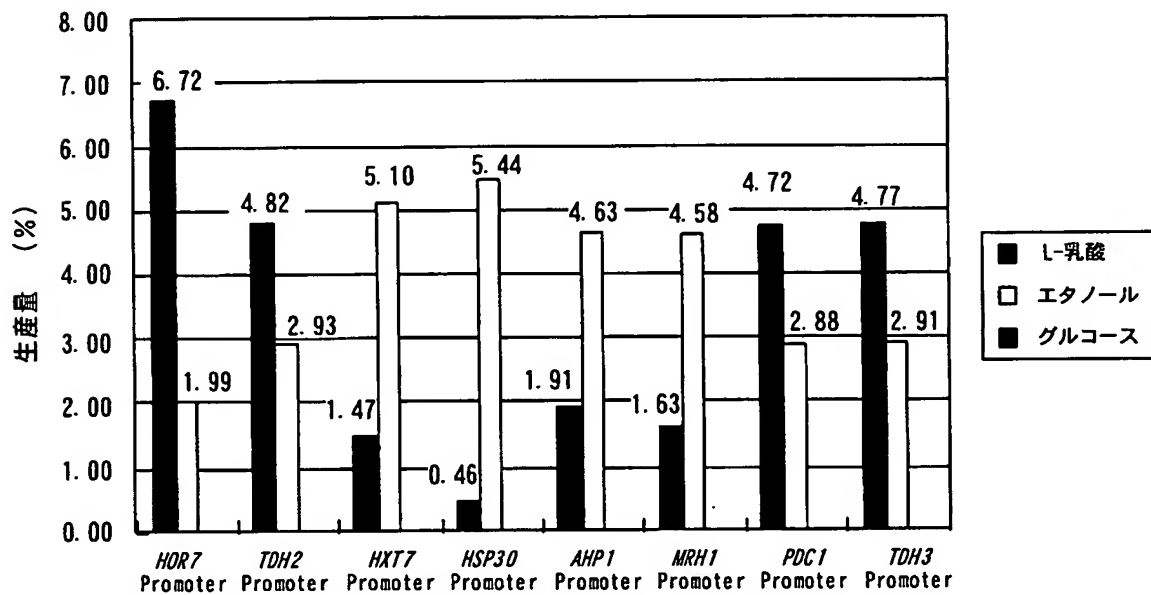
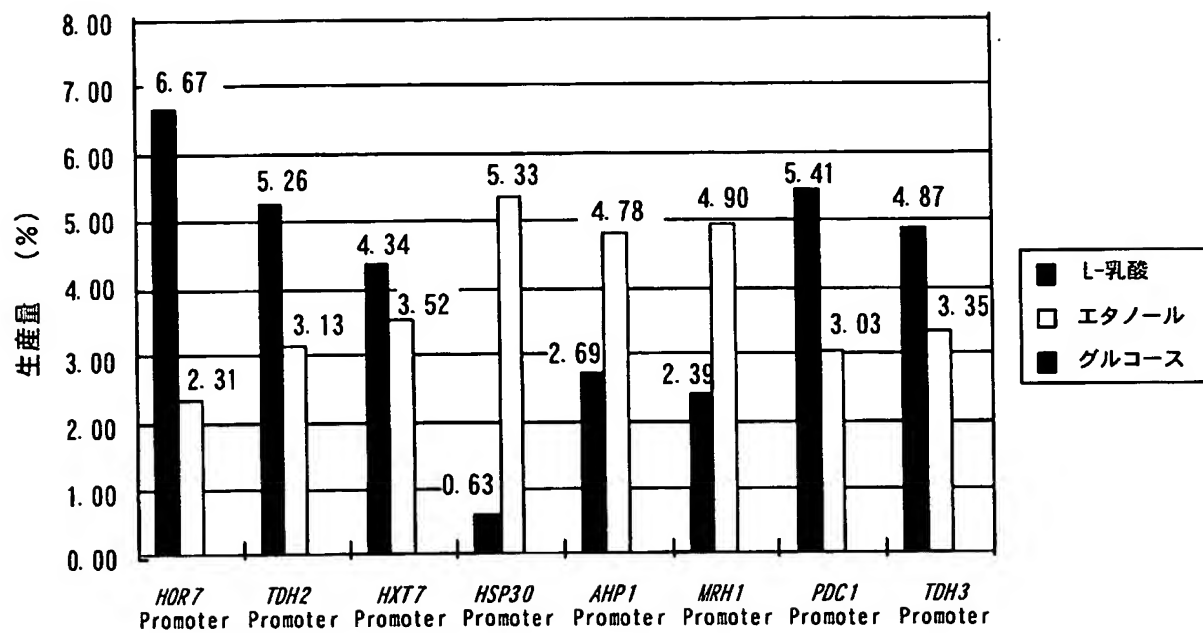


図20



10/10

図21



1/23

配列表

SEQUENCE LISTING

<110> Toyota Central R&D Labs., Inc.
Toyota Jidosha Kabushiki Kaisha

<120> Promotors effecting under exsisting organic acids

<130> FNTCA001W0

<150> JP2003-379076

<151> 2003-11-07

<160> 47

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 810

<212> DNA

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 1

ctcgctcgca gccacgggtc aacccgattg ggatcacccc actggggccc aagcctgata	60
tccgacctcc atgaaatttt ttttttctt tcgattagca cgcacacaca tcacatagac	120
tgcgtcataa aaatacacta cggaaaaacc ataaagagca aagcgatacc tacttggaag	180
gaaaaggagc acgcttgtaa gggggatggg ggctaagaag tcattcactt tcttttcctt	240
tcgcggtccg gacccgggac cctcctctc cccgcacgat ttcttccttt catacttcc	300
ttttattcct atcccgttga agcaaccgca ctatgactaa atggtgctgg acatctccat	360
ggctgtgact tgtgtgtatc tcacagtggg aacggcaccc tggtcggaa acggttcctt	420
cgtgacaatt ctagaacagg ggctacagtc cggataatag aataataagc gcatttttgc	480
tagcgccgcc gcggcgcccg ttccccaata gggaggcgca gtttatcggc ggagctctac	540
ttcttcctat ttgggtaagc ccttttctgt ttccggccag tggttgctgc aggctgcgcc	600
ggagaacata gtgataaggg atgtaacttt cgatgagaga attagcaagc ggaaaaaac	660
tatggctagc tgggagttgt ttttcaatca tataaaaggg agaaattgtt gctcactatg	720
tgacagtttc tgggacgtct taacttttat tgcagaggac tatcaaatca tacagatatt	780

2/23

gtcaaaaaaa aaaaagacta ataataaaaa 810

<210> 2

<211> 869

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 2

cttgacgggt attctgagca tcttactcag tttcaagatc ttttaatgtc caaaaacatt 60
 tgagccgac taaatatttc tgtgttttca ttaatttata aattgtactc ttttaagaca 120
 tggaaagtac caacatcggt tgaacagtt tttcatttac atatggttta ttggtttttc 180
 cagtgaatga ttatttgcg ttaccctttc gtaaaagttc taacacgttt ttaagtattg 240
 tttagtgtct ctttcgacat atatgattat ccttgcgcgg ctaaagttaa agatgcaaaa 300
 aacgtaagac aactgaagtt aatttacgtc aattaagttt tccagggtta tgatgttttg 360
 ggcttccact aattcaataa gtgtgtcatg aaatacgttg tgaagagcat ccagaaataa 420
 tgaagagaaa caacgaaact gggtcggcct gttgtttctt ttctttacca cgtgatctgc 480
 ggcatttaca ggaagtcgct cgttttgcgc agttgttgca acgcagctac ggctaacaaa 540
 gcctagtgga actcgactga tgtgttaggg cctaaaactg gtggtgacag ctgaagtga 600
 ctattcaatc caatcatgtc atggctgtca caaagacctt gcggaccgca cgtacgaaca 660
 catacgtatg ctaatatgtg ttttgatagt acccagtgat cgcagacctg caattttttt 720
 gtaggttttg aagaatatat aaaggttgca ctcatccaag atagtttttt tcttgtgtgt 780
 ctattcattt tattattgtt tgtttaaatg ttaaaaaaac caagaactta gtttcaaatt 840
 aaattcatca cacaacaaaa caaaacaaa 869

<210> 3

<211> 957

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 3

gccctgctaa acacgccta ctaaactt caaaagcaac ttaaaatatt tttatctaatt 60

3/23

tatagctaaa acccaatgtg aaagacatat catactgtaa aagtgaaaaa gcagcaccgt	120
tgaacgccgc aagagtgtc ccataacgct ttactagagg gctagatitt aatggccct	180
tcatggagaa gttatgagga caaatccac tacagaaagc gcaacaaatt ttttttccg	240
taacaacaaa catctcatct agtttctgcc ttaaacaag cgcagccag agccgtttt	300
cgcctatatt tatccaggat tgtccatac ggctccgtca gaggtgcta cgggatgtt	360
tttttttacc ccgtggaaat gaggggtatg caggaattg tgcgggtag gaaatcttt	420
tttttttag gaggaacaac tgggtgaaga atgccacac ttctcagaaa tgcattcagt	480
ggcagcacgc taattcgaaa aaattctcca gaaaggcaac gcaaaattt tttccagg	540
aataaacttt ttatgacca ctacttctcg taggaacaat ttcgggccc tgcgtgttct	600
tctgaggttc atcttttaca ttgtctctg ctggataatt ttccaggca acaaggaaaa	660
attagatggc aaaaagtcgt ctttcaagga aaaatcccca ccatcttctg agatcccctg	720
taacttattg gcaactgaaa gaatgaaaag gaggaaaata caaatatac tagaactgaa	780
aaaaaaaaag tataaataga gacgatatat gccaatactt cacaatgtc gaattcttc	840
ttcatttgca gctattgtaa aataataaaa catcaagaac aaacaagctc aacttgtctt	900
ttctaagaac aaagaataaa cacaaaaaca aaaagttttt ttaatttta tcaaaaa	957

<210> 4

<211> 940

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 4

cgctgaatac gtccgtgcaa ttcaaatata tcacgttgtg agcagcccta aagaagaaaa	60
cctcaacagc agtattacta ttacaatcaa acaacttttag tgccgctga taccgggggt	120
tgaagtgggt gcattgagcc gtattcttct tccccgtaag aaagtttgt atccttttta	180
ctgcgttgta atagcttctg aaaacctaaa aatgaacgc tatgtagctc atatccgttt	240
tgcataagta agaataacta cttgtgcagg gtgccgaaag gcatggaaaa ccgctgcagc	300
aaccttggtt acatacagtc ggatccatct gacttacttt ccttgcgtct ccctgcgcga	360

4/23

ttttgttggc cattttccag atcctctaga atttttcaag ggtcgagccg taggaggatt 420
 ctctcagaag gcaaaaacgc atcgaaagcg tgctttgtaa gaatatttgg tatggctaaa 480
 gtaagcaaag ccataatccc atcccgatcc cgactcttat tccgatccct tccgccacat 540
 cctgcatgtt tattcgaata ccaaattagc tcatcttcgt tatttcacat tccctttctg 600
 ctatggcaag gacaagtttt tttctagcat ctcatcgaaa actttcctct ccctaattgg 660
 ccaaagtttt catattcatc atcagttaga aagtataata tcaatccctt acctcattac 720
 aagtgtatc acactaaaaa aatcatatat aagtctgtga gagtcttcaa ttatttagcg 780
 taacacctat tcaatttcta atcttgtttc ttgtttttac attctgcaat acaacacaac 840
 aacaaatatt aactcaatta ttattattta taattacaaa aacaaaacaa caagtttgag 900
 actttaatat cttttgatta ctaaaaacaa caaatttcaa 940

<210> 5
 <211> 800
 <212> DNA
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 5
 cgcacccgaa ttcaatgtag cacctgagat ctcaaatagc ttttggccaa tcctaattct 60
 gaaaacttca tggtttggta aaagctcggg ggtagtttct aactcttttg tataaaccac 120
 gatctcgccc ttttggccag acatctgata tgagcgtgcg tgtgagtac ttacacttg 180
 tctatccacg tcctgaagtt gttcgtgttc tttggatatt cgtgttcaag ctaataatga 240
 gcctttaagg taatacaatt tataaaccac caccttggcc tcgatctatt gcgcttatgt 300
 tgtctattag taatcaagaa aagaacccta aatcatcggc gtcccctgtg gggctctcgg 360
 aaaaaccggt cctgacgtca ctgaaaagat ttcggcacat ggtcatggga ccagagaaaa 420
 attaatccga catgtggaat atttccttcc gtttaaggtag tgagcgcgga ttttttctga 480
 tttgtaatta tacggggagc tctggccaaa aaggtcagta tttggtgatg aagttgaata 540
 tcatcttttg attttcttct gtatcattct ttttcttttt ccacaccct tccggacggt 600
 attcacatat tgttgagagg ttaaatgaaa aataaagggg tggaaaatta aggacgagat 660

5/23

gtaagggaag agcataaacg aaacattata taaaggagca caatttcctc tcccttgcca 720
 attgtgcata tacggtttct ttataacgaa atttcaacaa accagaacaa cacaagtact 780
 accaataacc acaacaaaac 800

<210> 6
 <211> 901
 <212> DNA
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 6
 tcgatggaag atgcaacttg caaatgtagt ccggttacca agagacccaa acctcttcca 60
 ctttactatt tctcctttga gaaatatatc agtttgcggt aataggtaat atgaaaaagg 120
 caataaaaaa aagagatact tgtcaccatc tcgtctccct ttaccttttt tacttaatct 180
 tcttcgtcgt catctgttcc atccctttcc tagcttagtc ttctccggct agttcttagt 240
 gcggtaagca aaaaaatagc gttttttttc cctcaccagg actttttttg ttaaccgaaa 300
 atcggcatct ctagttttcc tggacaaaaa agacaaaatg gaaataaaca ctcatagaa 360
 tcagtaaaga tgtaaataat cgcagtaacg actgcacaag gatgtcagaa aaagcagttt 420
 aattccagaa gtggttttcc aatttatcac acatgtacat gaagggaat gtttaaatac 480
 ggtcttcgta aaacaaagga tctcttcacc tggtttcttc atttataagt agtgtctttt 540
 tcggtaactt aagatatatc cttatttctt tcccacttct cgttatttct tctttttccc 600
 ttttcaagtt cttcttttta tttattatta agcttatttt aattcttaga tcgttgtcac 660
 tatcttttgt ccttattggt aagaaacatt gcgaagaaaa agaataataa aagaaactca 720
 gaaaaaaaag aagtttcctc gaacaaaaat attattattt caataacttt ttctttctct 780
 acatccaatt ttttgaccct attttaacat taattttttg ctttaatttt aactaatacc 840
 taatttcact taatatctaa tcatcttctt ttaaccacaa gaacaaagaa gaaaaataac 900
 a 901

<210> 7
 <211> 999
 <212> DNA

6/23

<213> Bovine

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (999)

<223> Lactate Dehydrogenase

<400> 7

atg gca act ctc aag gat cag ctg att cag aat ctt ctt aag gaa gaa	48
Met Ala Thr Leu Lys Asp Gln Leu Ile Gln Asn Leu Leu Lys Glu Glu	
1 5 10 15	

cat gtc ccc cag aat aag att aca att gtt ggg gtt ggt gct gtt ggc	96
His Val Pro Gln Asn Lys Ile Thr Ile Val Gly Val Gly Ala Val Gly	
20 25 30	

atg gcc tgt gcc atc agt atc tta atg aag gac ttg gca gat gaa gtt	144
Met Ala Cys Ala Ile Ser Ile Leu Met Lys Asp Leu Ala Asp Glu Val	
35 40 45	

gct ctt gtt gat gtc atg gaa gat aaa ctg aag gga gag atg atg gat	192
Ala Leu Val Asp Val Met Glu Asp Lys Leu Lys Gly Glu Met Met Asp	
50 55 60	

ctc caa cat ggc agc ctt ttc ctt aga aca cca aaa att gtc tct ggc	240
Leu Gln His Gly Ser Leu Phe Leu Arg Thr Pro Lys Ile Val Ser Gly	
65 70 75 80	

aaa gac tat aat gtg aca gca aac tcc agg ctg gtt att atc aca gct	288
Lys Asp Tyr Asn Val Thr Ala Asn Ser Arg Leu Val Ile Ile Thr Ala	
85 90 95	

ggg gca cgt cag caa gag gga gag agc cgt ctg aat ttg gtc cag cgt	336
Gly Ala Arg Gln Gln Glu Gly Glu Ser Arg Leu Asn Leu Val Gln Arg	
100 105 110	

aac gtg aac atc ttt aaa ttc atc att cct aat att gta aaa tac agc	384
Asn Val Asn Ile Phe Lys Phe Ile Ile Pro Asn Ile Val Lys Tyr Ser	
115 120 125	

cca aat tgc aag ttg ctt gtt gtt tcc aat cca gtc gat att ttg acc	432
Pro Asn Cys Lys Leu Leu Val Val Ser Asn Pro Val Asp Ile Leu Thr	
130 135 140	

tat gtg gct tgg aag ata agt ggc ttt ccc aaa aac cgt gtt att gga	480
Tyr Val Ala Trp Lys Ile Ser Gly Phe Pro Lys Asn Arg Val Ile Gly	
145 150 155 160	

7/23

agt ggt tgc aat ctg gat tca gct cgc ttc cgt tat ctc atg ggg gag	528
Ser Gly Cys Asn Leu Asp Ser Ala Arg Phe Arg Tyr Leu Met Gly Glu	
165 170 175	
agg ctg gga gtt cac cca tta agc tgc cat ggg tgg atc ctt ggg gag	576
Arg Leu Gly Val His Pro Leu Ser Cys His Gly Trp Ile Leu Gly Glu	
180 185 190	
cat ggt gac tct agt gtg cct gta tgg agt gga gtg aat gtt gct ggt	624
His Gly Asp Ser Ser Val Pro Val Trp Ser Gly Val Asn Val Ala Gly	
195 200 205	
gtc tcc ctg aag aat tta cac cct gaa tta ggc act gat gca gat aag	672
Val Ser Leu Lys Asn Leu His Pro Glu Leu Gly Thr Asp Ala Asp Lys	
210 215 220	
gaa cag tgg aaa gcg gtt cac aaa caa gtg gtt gac agt gct tat gag	720
Glu Gln Trp Lys Ala Val His Lys Gln Val Val Asp Ser Ala Tyr Glu	
225 230 235 240	
gtg atc aaa ctg aaa ggc tac aca tcc tgg gcc att gga ctg tca gtg	768
Val Ile Lys Leu Lys Gly Tyr Thr Ser Trp Ala Ile Gly Leu Ser Val	
245 250 255	
gcc gat ttg gca gaa agt ata atg aag aat ctt agg cgg gtg cat ccg	816
Ala Asp Leu Ala Glu Ser Ile Met Lys Asn Leu Arg Arg Val His Pro	
260 265 270	
att tcc acc atg att aag ggt ctc tat gga ata aaa gag gat gtc ttc	864
Ile Ser Thr Met Ile Lys Gly Leu Tyr Gly Ile Lys Glu Asp Val Phe	
275 280 285	
ctt agt gtt cct tgc atc ttg gga cag aat gga atc tca gac gtt gtg	912
Leu Ser Val Pro Cys Ile Leu Gly Gln Asn Gly Ile Ser Asp Val Val	
290 295 300	
aaa gtg act ctg act cat gaa gaa gag gcc tgt ttg aag aag agt gca	960
Lys Val Thr Leu Thr His Glu Glu Glu Ala Cys Leu Lys Lys Ser Ala	
305 310 315 320	
gat aca ctt tgg ggg atc cag aaa gaa ctg cag ttt taa	999
Asp Thr Leu Trp Gly Ile Gln Lys Glu Leu Gln Phe	
325 330	

<210> 8
 <211> 332
 <212> PRT
 <213> Bovine

8/23

<400> 8

Met Ala Thr Leu Lys Asp Gln Leu Ile Gln Asn Leu Leu Lys Glu Glu
 1 5 10 15

His Val Pro Gln Asn Lys Ile Thr Ile Val Gly Val Gly Ala Val Gly
 20 25 30

Met Ala Cys Ala Ile Ser Ile Leu Met Lys Asp Leu Ala Asp Glu Val
 35 40 45

Ala Leu Val Asp Val Met Glu Asp Lys Leu Lys Gly Glu Met Met Asp
 50 55 60

Leu Gln His Gly Ser Leu Phe Leu Arg Thr Pro Lys Ile Val Ser Gly
 65 70 75 80

Lys Asp Tyr Asn Val Thr Ala Asn Ser Arg Leu Val Ile Ile Thr Ala
 85 90 95

Gly Ala Arg Gln Gln Glu Gly Glu Ser Arg Leu Asn Leu Val Gln Arg
 100 105 110

Asn Val Asn Ile Phe Lys Phe Ile Ile Pro Asn Ile Val Lys Tyr Ser
 115 120 125

Pro Asn Cys Lys Leu Leu Val Val Ser Asn Pro Val Asp Ile Leu Thr
 130 135 140

Tyr Val Ala Trp Lys Ile Ser Gly Phe Pro Lys Asn Arg Val Ile Gly
 145 150 155 160

Ser Gly Cys Asn Leu Asp Ser Ala Arg Phe Arg Tyr Leu Met Gly Glu
 165 170 175

Arg Leu Gly Val His Pro Leu Ser Cys His Gly Trp Ile Leu Gly Glu
 180 185 190

9/23

His Gly Asp Ser Ser Val Pro Val Trp Ser Gly Val Asn Val Ala Gly
 195 200 205

Val Ser Leu Lys Asn Leu His Pro Glu Leu Gly Thr Asp Ala Asp Lys
 210 215 220

Glu Gln Trp Lys Ala Val His Lys Gln Val Val Asp Ser Ala Tyr Glu
 225 230 235 240

Val Ile Lys Leu Lys Gly Tyr Thr Ser Trp Ala Ile Gly Leu Ser Val
 245 250 255

Ala Asp Leu Ala Glu Ser Ile Met Lys Asn Leu Arg Arg Val His Pro
 260 265 270

Ile Ser Thr Met Ile Lys Gly Leu Tyr Gly Ile Lys Glu Asp Val Phe
 275 280 285

Leu Ser Val Pro Cys Ile Leu Gly Gln Asn Gly Ile Ser Asp Val Val
 290 295 300

Lys Val Thr Leu Thr His Glu Glu Glu Ala Cys Leu Lys Lys Ser Ala
 305 310 315 320

Asp Thr Leu Trp Gly Ile Gln Lys Glu Leu Gln Phe
 325 330

<210> 9

<211> 971

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 9

aagggtagcc tccccataac ataaactcaa taaaatatat agtcttcaac ttgaaaaagg 60

aacaagctca tgcaaagagg tggtagccgc acgccgaaat gcatgcaagt aacctattca 120

aagtaatatc tcatacatgt ttcatgaggg taacaacatg cgactgggtg agcatatgct 180

10/23

```

ccgctgatgt gatgtgcaag ataaacaagc aagacggaaa ctaacttctt cticcatgtaa 240
taaacacacc ccgcgtttat ttacctatct ttaaacttca acaccttata tcataactaa 300
tatttcttga gataagcaca ctgcacccat accttcctta aaagcgtagc ttccagtttt 360
tggtggttcc ggcttccttc ccgattccgc ccgctaaacg catatTTTTg ttgcctggtg 420
gcatttgcaa aatgcataac ctatgcattt aaaagattat gtatgctctt ctgacttttc 480
gtgtgatgaa gctcgtggaa aaaatgaata atttatgaat ttgagaacaa ttctgtgttg 540
ttacggtatt ttactatgga ataattaatc aattgaggat ttatgcaaa tatcgtttga 600
atatTTTTcc gacctttga gtacttttct tcataattgc ataatatgt ccgctgcccg 660
ttttctgtt agacggtgtc ttgatctact tgctatcgtt caacaccacc ttattttcta 720
actatTTTT ttttagctca tttgaatcag cttatgggtga tggcacattt ttgcataaac 780
ctagctgtcc tcgttgaaca taggaaaaaa aaatatatta acaaggctct ttcactctcc 840
ttgcaatcag atttgggttt gticccttta ttttcatatt tcttgcata ttcctttctc 900
aattattatt ttctactcat aaccacacgc aaaataacac agtcaaata atcaaagatc 960
ccccaattct c 971

```

<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic primer

<400> 10
cgtcgccttc actggttttag

20

<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthtic primer

11/23

<400> 11
caaaaaggcc aaagcaccag 20

<210> 12
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthtic primer

<400> 12
caaggttaagt tgaccggtat g 21

<210> 13
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic primer

<400> 13
gatggaagag ttagagtcac cc 22

<210> 14
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthtic primer

<400> 14
tcatgggctg tttggtcttc 20

<210> 15
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic primer

12/23

<400> 15
agcgtcgtag ttggcacctc

20

<210> 16
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic primer

<400> 16
aatgtcagtc agccgtgatg

20

<210> 17
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic primer

<400> 17
tcgacagctt gctctgcttc

20

<210> 18
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic primer

<400> 18
aaccaagcgt gggctaagag

20

<210> 19
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic primer

<400> 19

13/23

ggtttccttg gcagcgtaag

20

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic primer

<400> 20

gctgcctgtg ttcactccac

20

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthtic primer

<400> 21

tggctgcaaa acgttaccac

20

<210> 22

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic primer

<400> 22

caacgaattg aacgctgctt ac

22

<210> 23

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic primer

<400> 23

attcaacggc ttccttaact tctg

24

14/23

<210> 24
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic primer

<400> 24
gttttcaagg aattagacac tgc

23

<210> 25
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic primer

<400> 25
caacagtctt ttgagtagca gtc

23

<210> 26
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic primer

<400> 26
atatatgcgg ccgctcgcag ccacgggtca acccg

35

<210> 27
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic primer

<400> 27
atatatacta gtttttattia ttagtctttt tttttttga c

41

15/23

<210> 28
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic primer

<400> 28
atatatgcgg ccgcttgacg ggtattctga gcattctac

39

<210> 29
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic primer

<400> 29
tatatactag ttgttttgt ttgtttgtgt gatgaatt

38

<210> 30
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> sybthetic primer

<400> 30
atatatgcgg ccgccctgct aaacacgccc tac

33

<210> 31
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic primer

<400> 31
atatatacta gtttttgatt aaaattaaaa aaactttttg

40

16/23

<210> 32
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic primer

<400> 32
atatatgcgg cgcgtgaata cgtcctgtca attc

34

<210> 33
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic primer

<400> 33
atatatacta gttgaaattt gttgttttta gtaatc

36

<210> 34
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic primer

<400> 34
atatatgcgg cgcgatccga attcaatgta gcacc

35

<210> 35
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic primer

<400> 35
atatatacta gtgttttggt gtggttattg gtagtac

37

<210> 36

17/23

<211> 47
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic primer

<400> 36
agctagctag cggccgcgat ggaagatgca acttgcaaat gtagtcc

47

<210> 37
<211> 47
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic primer

<400> 37
agctagctac tagtgttatt tttcttcttt gttctgtggg ttaaagg

47

<210> 38
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic primer

<400> 38
agctagctag cggccgcggtt gaatgttagc gtcaacaaca ag

42

<210> 39
<211> 47
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic primer

<400> 39
agctagctac tagtttgttt gtttatgtgt gtttattcga aactaag

47

<210> 40
<211> 42

18/23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic primer

<400> 40

agctagctag cggccgcgtt gaatgttagc gtcaacaaca ag

42

<210> 41

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic primer

<400> 41

tatatactag tttgattgat ttgactgtgt tattttg

37

<210> 42

<211> 1052

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<220>

<221> CDS

<222> (13).. (1011)

<223>

<400> 42

acagaattca ca atg gct act ttg aaa gat caa ttg att caa aat ttg ttg
 Met Ala Thr Leu Lys Asp Gln Leu Ile Gln Asn Leu Leu
 1 5 10

51

aaa gaa gaa cat gtt cca caa aat aaa att act att gtt ggt gtt ggt
 Lys Glu Glu His Val Pro Gln Asn Lys Ile Thr Ile Val Gly Val Gly
 15 20 25

99

gct gtt ggt atg gct tgt gct att tct att ttg atg aaa gat ttg gct
 Ala Val Gly Met Ala Cys Ala Ile Ser Ile Leu Met Lys Asp Leu Ala
 30 35 40 45

147

gat gaa gtt gct ttg gtt gat gtt atg gaa gat aaa ttg aaa ggt gaa

195

19/23

Asp	Glu	Val	Ala	Leu	Val	Asp	Val	Met	Glu	Asp	Lys	Leu	Lys	Gly	Glu		
				50					55					60			
atg	atg	gat	ttg	caa	cat	ggc	tct	ttg	ttt	ttg	aga	act	cca	aaa	att		243
Met	Met	Asp	Leu	Gln	His	Gly	Ser	Leu	Phe	Leu	Arg	Thr	Pro	Lys	Ile		
			65					70					75				
gtt	tct	ggc	aaa	gat	tat	aat	gtt	act	gct	aat	tct	aga	ttg	gtt	att		291
Val	Ser	Gly	Lys	Asp	Tyr	Asn	Val	Thr	Ala	Asn	Ser	Arg	Leu	Val	Ile		
		80					85					90					
att	act	gct	ggc	gct	aga	caa	caa	gaa	ggc	gaa	tct	aga	ttg	aat	ttg		339
Ile	Thr	Ala	Gly	Ala	Arg	Gln	Gln	Glu	Gly	Glu	Ser	Arg	Leu	Asn	Leu		
	95					100					105						
gtt	caa	aga	aat	gtt	aat	att	ttt	aaa	ttt	att	att	cca	aat	att	gtt		387
Val	Gln	Arg	Asn	Val	Asn	Ile	Phe	Lys	Phe	Ile	Ile	Pro	Asn	Ile	Val		
110					115					120					125		
aaa	tat	tct	cca	aat	tgt	aaa	ttg	ttg	gtt	gtt	tct	aat	cca	gtt	gat		435
Lys	Tyr	Ser	Pro	Asn	Cys	Lys	Leu	Leu	Val	Val	Ser	Asn	Pro	Val	Asp		
				130					135					140			
att	ttg	act	tat	gtt	gct	tgg	aaa	att	tct	ggc	ttt	cca	aaa	aat	aga		483
Ile	Leu	Thr	Tyr	Val	Ala	Trp	Lys	Ile	Ser	Gly	Phe	Pro	Lys	Asn	Arg		
			145					150					155				
gtt	att	ggc	tct	ggc	tgt	aat	ttg	gat	tct	gct	aga	ttt	aga	tat	ttg		531
Val	Ile	Gly	Ser	Gly	Cys	Asn	Leu	Asp	Ser	Ala	Arg	Phe	Arg	Tyr	Leu		
		160					165					170					
atg	ggc	gaa	aga	ttg	ggc	gtt	cat	cca	ttg	tct	tgt	cat	ggc	tgg	att		579
Met	Gly	Glu	Arg	Leu	Gly	Val	His	Pro	Leu	Ser	Cys	His	Gly	Trp	Ile		
	175					180					185						
ttg	ggc	gaa	cat	ggc	gat	tct	tct	gtt	cca	gtt	tgg	tct	ggc	gtt	aat		627
Leu	Gly	Glu	His	Gly	Asp	Ser	Ser	Val	Pro	Val	Trp	Ser	Gly	Val	Asn		
190					195					200					205		
gtt	gct	ggc	gtt	tct	ttg	aaa	aat	ttg	cat	cca	gaa	ttg	ggc	act	gat		675
Val	Ala	Gly	Val	Ser	Leu	Lys	Asn	Leu	His	Pro	Glu	Leu	Gly	Thr	Asp		
				210					215					220			
gct	gat	aaa	gaa	caa	tgg	aaa	gct	gtt	cat	aaa	caa	gtt	gtt	gat	tct		723
Ala	Asp	Lys	Glu	Gln	Trp	Lys	Ala	Val	His	Lys	Gln	Val	Val	Asp	Ser		
			225					230					235				
gct	tat	gaa	gtt	att	aaa	ttg	aaa	ggc	tat	act	tct	tgg	gct	att	ggc		771
Ala	Tyr	Glu	Val	Ile	Lys	Leu	Lys	Gly	Tyr	Thr	Ser	Trp	Ala	Ile	Gly		

20/23

240	245	250	
ttg tct gtt gct gat ttg gct gaa tct att atg aaa aat ttg aga aga			819
Leu Ser Val Ala Asp Leu Ala Glu Ser Ile Met Lys Asn Leu Arg Arg			
255	260	265	
ggt cat cca att tct act atg att aaa ggt ttg tat ggt att aaa gaa			867
Val His Pro Ile Ser Thr Met Ile Lys Gly Leu Tyr Gly Ile Lys Glu			
270	275	280	285
gat gtt ttt ttg tct gtt cca tgt att ttg ggt caa aat ggt att tct			915
Asp Val Phe Leu Ser Val Pro Cys Ile Leu Gly Gln Asn Gly Ile Ser			
290	295	300	
gat gtt gtt aaa gtt act ttg act cat gaa gaa gaa gct tgt ttg aaa			963
Asp Val Val Lys Val Thr Leu Thr His Glu Glu Glu Ala Cys Leu Lys			
305	310	315	
aaa tct gct gat act ttg tgg ggt att caa aaa gaa ttg caa ttt taa			1011
Lys Ser Ala Asp Thr Leu Trp Gly Ile Gln Lys Glu Leu Gln Phe			
320	325	330	
taactcgagc ttggttgaac acgttgccaa ggcttaagtg a			1052

<210> 43
 <211> 332
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> synthetic DNA

<400> 43

Met	Ala	Thr	Leu	Lys	Asp	Gln	Leu	Ile	Gln	Asn	Leu	Leu	Lys	Glu	Glu
1				5				10						15	

His	Val	Pro	Gln	Asn	Lys	Ile	Thr	Ile	Val	Gly	Val	Gly	Ala	Val	Gly
			20					25					30		

Met	Ala	Cys	Ala	Ile	Ser	Ile	Leu	Met	Lys	Asp	Leu	Ala	Asp	Glu	Val
		35					40					45			

Ala	Leu	Val	Asp	Val	Met	Glu	Asp	Lys	Leu	Lys	Gly	Glu	Met	Met	Asp
						50			55		60				

21/23

Leu Gln His Gly Ser Leu Phe Leu Arg Thr Pro Lys Ile Val Ser Gly
65 70 75 80

Lys Asp Tyr Asn Val Thr Ala Asn Ser Arg Leu Val Ile Ile Thr Ala
85 90 95

Gly Ala Arg Gln Gln Glu Gly Glu Ser Arg Leu Asn Leu Val Gln Arg
100 105 110

Asn Val Asn Ile Phe Lys Phe Ile Ile Pro Asn Ile Val Lys Tyr Ser
115 120 125

Pro Asn Cys Lys Leu Leu Val Val Ser Asn Pro Val Asp Ile Leu Thr
130 135 140

Tyr Val Ala Trp Lys Ile Ser Gly Phe Pro Lys Asn Arg Val Ile Gly
145 150 155 160

Ser Gly Cys Asn Leu Asp Ser Ala Arg Phe Arg Tyr Leu Met Gly Glu
165 170 175

Arg Leu Gly Val His Pro Leu Ser Cys His Gly Trp Ile Leu Gly Glu
180 185 190

His Gly Asp Ser Ser Val Pro Val Trp Ser Gly Val Asn Val Ala Gly
195 200 205

Val Ser Leu Lys Asn Leu His Pro Glu Leu Gly Thr Asp Ala Asp Lys
210 215 220

Glu Gln Trp Lys Ala Val His Lys Gln Val Val Asp Ser Ala Tyr Glu
225 230 235 240

Val Ile Lys Leu Lys Gly Tyr Thr Ser Trp Ala Ile Gly Leu Ser Val
245 250 255

22/23

Ala Asp Leu Ala Glu Ser Ile Met Lys Asn Leu Arg Arg Val His Pro
260 265 270

Ile Ser Thr Met Ile Lys Gly Leu Tyr Gly Ile Lys Glu Asp Val Phe
275 280 285

Leu Ser Val Pro Cys Ile Leu Gly Gln Asn Gly Ile Ser Asp Val Val
290 295 300

Lys Val Thr Leu Thr His Glu Glu Glu Ala Cys Leu Lys Lys Ser Ala
305 310 315 320

Asp Thr Leu Trp Gly Ile Gln Lys Glu Leu Gln Phe
325 330

<210> 44
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic primer

<400> 44
atatatggat ccgcgtttat ttacctatct c

31

<210> 45
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic primer

<400> 45
atatatgaat tctttgattg atttgactgt g

31

<210> 46
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial

23/23

<220>

<223> synthetic primer

<400> 46

atatatctcg aggccagcta acttcttggt cgac

34

<210> 47

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic primer

<400> 47

atatatgaat tctttgattg atttgactgt g

31

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/016799

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/00, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/00, C12P7/40, C12P7/56

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/00, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/00, C12P7/40, C12P7/56

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2001/038549 A1 (Astrazeneca AB), 31 May, 2001 (31.05.01), Fig. 14, Seq.ID.No.2, example 3, (Database Genbank/EMBL/DDBJ Accession No.AAD07503, AAD07493), & EP 1235917 A1 & JP 2003-514566 A & US 2004/142478 A1	1-3, 13, 17, 22, 30, 31 4-12, 14-16, 18-21, 23-29
X Y	WO 1984/04538 A1 (Unilever NV), 22 November, 1984 (22.11.84), Figs. 2, 16, 17; page 38, line 33 to page 40, line 34 (Database Genbank/EMBL/DDBJ Accession No.AAN40212) & DK 24785 A & EP 129268 A2 & JP 60-501290 A	1-3, 13, 17, 22, 30, 31 4-12, 14-16, 18-21, 23-29

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
27 January, 2005 (27.01.05)Date of mailing of the international search report
15 February, 2005 (15.02.05)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/016799

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2002/000880 A1 (Gothia Yeast Solutions AB), 03 January, 2002 (03.01.02), Example 1; Seq.ID.No.5; Claims (Database Genbank/EMBL/DDBJ Accession No.ABA94597) & SE 2001002342 A & CA 2414137 A & EP 1297144 A1 & JP 2004-501643 A & ZA 2002010036 A & US 2004/058429 A1	1-3, 13, 17, 22, 30, 31 4-12, 14-16, 18-21, 23-29
X Y	Hauf, J. et al., "Simultaneous genomic overexpression of seven glycolytic enzymes in the yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ", Enzyme and Microbial Technology, (2000), Vol.26, Nos. 9 to 10, pages 688 to 698	1-3, 13, 17, 22, 30, 31 4-12, 14-16, 18-21, 23-29
X Y	Riou, C. et al., "Stationary-phase gene expression in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> during wine fermentation", Yeast, (1997), Vol.13, No.10, pages 903 to 915	1-3, 13, 17, 22, 30, 31 4-12, 14-16, 18-21, 23-29
X Y	WO 2002/064766 A2 (Janssen Pharmaceutica NV), 22 August, 2002 (22.08.02), Claim 36; Seq.ID.No.79, page 65, tables; Seq.ID.No.119, page 66, tables (Database Genbank/EMBL/DDBJ/Accession No. ABQ76327, ABQ76347) & CA 2432364 A & EP 1346044 A2 & US 2004/161840 A1	1-3, 30, 31 4-29
Y	Wu, K. et al., "Expression and subcellular localization of a membrane protein related to Hsp30p in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ", Biochimica et Biophysica Acta, (2000), Vol.1463, No.2, pages 477 to 482	1-31
Y	JP 2003-164295 A (Toyota Motor Corp.), 10 June, 2003 (10.06.03), Claims; examples; cited in the present application & WO 2003/027280 A1 & JP 2003-164294 A & EP 1437405 A	1-31

BEST AVAILABLE COPY

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/016799

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

As reported in a plural number of documents (WO 2001/038549 A1; WO 1984/04538 A1; WO 2002/000880 A1; Enzyme and Microbial Technology, (2000), Vol.26, Nos.9-10, pp.688-698; and Yeast, (1997), Vol.13, No.10, pp.903-915), various promoters originating in *Saccharomyces cerevisiae* such as the HOR7 gene promoter as described in the present case have been publicly known by those skilled in the art.

Thus, the acquisition, selection or utilization of promoters having a specific structure or property cannot be regarded as "a special technical feature" of the present case.

Therefore, the present claims have six (continued to extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/016799

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

groups of inventions which relate respectively to nucleic acids containing six types of promoters differing in structure from each other and utilization thereof and have no novel special technical feature in common. Such being the case, the present international application does not comply with the requirement of unity of invention (Article 13 for the enforcement of the Law (PCT Rules 13.1, 13.2 and 13.3)).

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N15/00, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/00, C12P7/40, C12P7/56

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N15/00, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/00, C12P7/40, C12P7/56

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X — Y	WO 2001/038549 A1 (Astrazeneca AB), 2001.05.31, Fig.14, Seq ID No.2, Example 3 参照 (Database Genbank/EMBL/D DBJ Accession No. AAD07503, AAD07493も参照) & EP 1235917 A1 & JP 2003-514566 A & US 2004/142478 A1	1-3, 13, 17, 22, 30, 31 4-12, 14-16, 18-21, 23-29
X — Y	WO 1984/04538 A1 (Unilever NV), 1984.11.22, Fig.2, 16, 17, 第38頁第33行-第40頁第34行参照 (Database Genbank /EMBL/DDBJ Accession No. AAN40212も参照) & DK 24785 A & EP 129268 A2 & JP 60-501290 A	1-3, 13, 17, 22, 30, 31 4-12, 14-16, 18-21, 23-29

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27.01.2005

国際調査報告の発送日

15.2.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新留 豊

4B

9639

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X - Y	WO 2002/000880 A1 (Gothia Yeast Solutions AB), 2002. 01. 03, Example 1, Seq ID No. 5, 請求の範囲参照 (Database Genbank/EMB L/DDBJ Accession No. ABA94597も参照) & SE 2001002342 A & CA 2414137 A & EP 1297144 A1 & JP 2004-501643 A & ZA 2002010036 A & US 2004/058429 A1	1-3, 13, 17, <u>22, 30, 31</u> 4-12, 14-16, 18-21, 23-29
X - Y	Hauf, J., et al., "Simultaneous genomic overexpression of seven glycolytic enzymes in the yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> " Enzyme and Microbial Technology, (2000), Vol. 26, No. 9-10, pp. 688-698	1-3, 13, 17, <u>22, 30, 31</u> 4-12, 14-16, 18-21, 23-29
X - Y	Riou, C. et al., "Stationary-phase gene expression in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> during wine fermentation" Yeast, (1997), Vol. 13, No. 10, pp. 903-915	1-3, 13, 17, <u>22, 30, 31</u> 4-12, 14-16, 18-21, 23-29
X Y	WO 2002/064766 A2 (Janssen Pharmaceutica NV), 2002. 08. 22, 請求の範囲36, Seq ID No. 79及び第65頁の表, 並びにSeq ID No. 11 9及び第66頁の表参照 (Database Genbank/EMBL/DDBJ Accession N o. ABQ76327, ABQ76347も参照) & CA 2432364 A & EP 1346044 A2 & US 2004/161840 A1	<u>1-3, 30, 31</u> 4-29
Y	Wu, K. et al., "Expression and subcellular localization of a membrane protein related to Hsp30p in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> " Biochimica et Biophysica Acta, (2000), Vol. 1463, No. 2, pp. 477-482	1-31
Y	JP 2003-164295 A (トヨタ自動車株式会社), 2003. 06. 10, 請求の範囲及び実施例参照, 本願で引用 & WO 2003/027280 A1 & JP 2003-164294 A & EP 1437405 A	1-31

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

複数の文献 (WO 2001/038549 A1 ; WO 1984/04538 A1 ; WO 2002/000880 A1 ; Enzyme and Microbial Technology, (2000), Vol. 26, No. 9-10, pp. 688-698 ; Yeast, (1997), Vol. 13, No. 10, pp. 903-915) にも記載されるとおり、本願に記載されたHOR7遺伝子のプロモーター等、種々のSaccharomyces cerevisiae由来のプロモーターは当業者に公知である。

したがって、特定の構造または性質を有するプロモーター取得し、選択し、または使用した点をもって本願の「特別な技術的特徴」とすることはできない。

よって、請求の範囲には、構造が異なる6種類のプロモーターを含む核酸及びそれぞれの使用に関連し、新規な特別な技術的特徴が共有されていない6つの発明が記載されているため、この国際出願は発明の単一性の要件 (法施行規則第 13条 (PCT規則13.1、13.2及び13.3)) を満たしていない。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列 (第 1 ページの 1. b の続き)

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。

a. タイプ ☒ 配列表

☐ 配列表に関連するテーブル

b. フォーマット ☐ 書面

☒ コンピュータ読み取り可能な形式

c. 提出時期 ☐ 出願時の国際出願に含まれる

☒ この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された

☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された

2. ☒ さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見：